

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften

**Der Einfluss von Nonylphenolen auf die Entwicklung
des Nervensystems und die synaptische Plastizität**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (Dr. troph.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Carina Jockschat

aus

Gelsenkirchen

Bonn, 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2019

1. Berichterstatterin: Frau PD Dr. Simone Diestel
2. Berichterstatterin Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein
3. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Klaus Günther

Meinem lieben Opa Karl

„(...) Weiter bringt mich keiner, du mein Rückenwind (...)”

(Heinz Rudolf Kunze)

Abstract

Nonylphenols are a group of chemical compounds consisting of an aromatic ring, hydroxyl group and a nonyl- side chain, which can be either branched or linear. The technical nonylphenol, produced in the industrial process, consists of a mixture of different constitutional isomers and enantiomers and serves as a precursor of nonylphenol ethoxylates. Due to their good surfactant properties, nonylphenol ethoxylates are widely used as detergents and cleansing formulations, as agents in paints and as coatings. In sewage treatment plants nonylphenol derivatives are then degraded to the toxic, persistent 4-NP. The chemical is found in many environmentally relevant matrices such as marine water, sediments and rivers and can be ubiquitously detected in food. Thus, nonylphenols were also identified in various human tissues in relatively high concentrations. Over skin, respiratory system and gastrointestinal tract a daily intake of approximately 7.5 µg/day in adults and up to 1.4 µg/day in infants are postulated. Nonylphenol are also able to cross the blood-brain barrier. Due to its chemical structure, it accumulates easily in lipophilic compartments of the body. Particularly high concentrations were therefore detected in the adipose tissue, but traces in a nanomolar range are also found in the umbilical cord blood, the placenta, breast milk and the brain itself. Since the 1990s, it has been known that nonylphenols belong to the group of endocrine disruptors. Those are able to displace the natural hormone 17β-estradiol from its receptor and thus competitively inhibit or trans-activate it. Through the xenobiotic action, the chemical mimics the effects of natural estradiol and leads to detectable disorders of the endocrine system and the sexual maturation in various organisms. It mediates its effects both via the classical estrogen receptors and via the membrane-bound G protein-coupled receptor GPR30. In addition to the known effects of nonylphenol as an endocrine disruptor, effects on the nervous system are also discussed. The chemical mediates neurotoxic effects *in vitro* in different neuronal cell types and inhibits neuronal outgrowth and proliferation of neural stem cells. In the present work it is shown that a technical nonylphenol mixture in a concentration range from 0.05 nM to 1 µM exerts no toxic effects on neuroblastoma cells of the line B35. However, incubation with the chemical significantly inhibits the average length of cell protrusions in B35 cells as well as in primary mouse cerebellar neurons. This effect might be partially attributable to an influence on the signal transduction of ERK1/2 kinases, which can be upstream influenced by steroids or hormone-like ligands such as nonylphenols. The xenoestrogen presumably leads to a competitive inhibition of the signaling pathway, which leads to further cellular modifications. As a result of nonylphenol treatment, primary cells

react with an inhibition in formation or in regression of synaptophysin-containing vesicles, which could converge in a reduced synaptic plasticity. Furthermore, under influence of the chemical, the distribution of actin and tubulin within the B35 cells, their proliferation and their adhesion and migration behavior change. Additionally, it is shown that the single nonylphenol isomers NP65, NP111 and NP112, respectively, influence the outgrowth of B35 cell protrusions in different manners. While the isomers NP65 and NP111 dose-dependently lead to a reduction of mean neurite lengths, the isomer NP112 shows no effect. In zebrafish application of the technical nonylphenol mixture into the fish water results in an increased formation or migration of immature oligodendrocyte progenitor cells and mature oligodendrocytes. In addition, sagittal sections of the zebrafish larvae show increased proliferation and apoptosis in the spinal cord of the fish. Increased migration or disturbed differentiation of myelinating oligodendroglial cells can lead to increased myelination of cell bodies. In summary, nonylphenols can alter fundamental processes of cell differentiation and neural mechanisms in different cellular systems and organisms, thus causing a negative impact on the development of the nervous system and the synaptic plasticity.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Einheitenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Einführung und Problemstellung	1
1.2 Struktur und Eigenschaften von NP	2
1.3 Vorkommen und Eintrag in die Umwelt	4
1.4 Metabolismus von NP	6
1.5 NP als hormonähnlicher Stoff	8
1.6 Neurotoxische Effekte von NP	14
1.7 Synaptische Plastizität und Lernen	17
1.8 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Modellsysteme	18
1.8.1 B35-Neuroblastomzellen und Kulturen von Kleinhirnneuronen	18
1.8.2 Zebrafärblinge (<i>Danio rerio</i>)	18
1.9 Die transgenen Fischlinien Tg(Olig2:eGFP) und Tg(CldnK(cyto):eGFP)	19
2 Zielsetzung	21
3 Materialien	23
3.1 Chemikalien	23
3.2 Geräte	25
3.3 Mikroskope	26
3.4 Software	27
3.5 Arbeitsmaterialien	27
3.6 Kits und Standards	28
3.7 Antikörper	29
3.8 Biologisches Material	30
3.8.1 Zelllinien	30
3.8.2 Primärneuronen	30
3.8.3 Transgene Fischlinien	30
3.9 Lösungen, Medien und Puffer	31
3.9.1 Allgemeine Puffer	31

3.9.2 Zellkulturmedien und andere Lösungen für die Zellkultur	31
3.9.3 Lösungen für immunfluoreszenzmikroskopische Analysen	32
3.9.4 Lösungen für proteinbiochemische Analysen	33
3.9.4.1 Lösungen für die Herstellung von Zelllysaten	33
3.9.4.2 Lösungen für die Ermittlung von Proteinkonzentrationen	33
3.9.4.3 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE) ...	33
3.9.4.4 Lösungen zur Färbung von Proteinen in SDS-Gelen	34
3.9.4.5 Lösungen für Westernblot und Immundetektion von Proteinen	34
3.9.4.6 Lösungen zur Färbung von Proteinen auf Membranen	34
3.9.5 Lösungen für die Zebrafisch-Versuche	35
4 Methoden	36
4.1 Zellbiologische Methoden	36
4.1.1 Kultivieren von Zellen	36
4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
4.1.3 Analyse der NP-Toxizität mittels MTT	37
4.1.4 Analyse der Zellproliferation mittels EdU	38
4.1.5 Analyse der Neuritenlängen und Neuritenanzahl	38
4.1.6 Analyse der Zelladhäsion mittels Crystal Violet	39
4.1.7 Analyse von α -Tubulin und F-Aktin	40
4.1.8 Methoden zur Ermittlung des Migrationsverhaltens	41
4.1.8.1 Wundheilungsassay	41
4.1.8.2 Sphäroid Formationsassay	41
4.1.8.3 Migration von Sphäroid-Zellen	42
4.1.9 Präparation und Kultivierung von Primärzellen	42
4.1.10 Analyse der Neuritenlängen von Kleinhirnneuronen	43
4.1.11 Analyse der Synaptophysin-haltigen Vesikel von Kleinhirnneuronen	43
4.2 Protein-biochemische Methoden	44
4.2.1 Zellyse	44
4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung von Zelllysaten	44
4.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.2.4 Färbung von Proteinen in Gelen	46
4.2.5 Westernblot	46
4.2.6 Immundetektion von Proteinen auf Membranen	47
4.2.7 Entfernung von Antikörpern auf Membranen	48
4.2.8 Färbung von Proteinen auf Membranen	48
4.3 Fischversuche	48

4.3.1	Fischhaltung und Aufzucht	48
4.3.2	Applikation von Substanzen in das Fischwasser	49
4.3.3	Auswertungen am 2-Photonen-Mikroskop, EnSight und Zeiss-Mikroskop	49
4.3.4	Sagittalschnitte von CldnK-Zebrafischen	49
4.4	Statistische Auswertung	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Der Einfluss von NP auf die Zellviabilität und -Proliferation	51
5.2	Der Einfluss von NP auf die morphologische Differenzierung von B35-Zellen	54
5.2.1	NP-Gemisch	54
5.2.2	NP-Isomere NP65, NP111 und NP112	58
5.3	Der Einfluss von NP auf die morphologische Differenzierung von Primärneuronen..	62
5.4	Der Einfluss von NP auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten.....	63
5.4.1	Migration.....	64
5.4.1.1	Wundheilungsassay.....	64
5.4.2	Adhäsion	65
5.4.3	Sphäroid-Formation und -Migration.....	66
5.5	Der Einfluss von NP auf die cytoskelettale Reorganisation	68
5.6	Der Einfluss von NP auf den ERK1/2-Signalweg	71
5.7	Der Einfluss von NP auf die synaptische Plastizität von Primärneuronen	74
5.8	Der Einfluss von NP auf die Zebrafisch-Entwicklung.....	76
5.8.1	Der Einfluss von NP auf die morphologische Entwicklung	76
5.8.2	Der Einfluss von NP auf die Migration von OPCs	77
5.8.3	Der Einfluss von NP auf reife Oligodendrocyten	80
5.8.4	Der Einfluss von NP auf Proliferation und Apoptose im ZNS	82
6	Diskussion	84
6.1	Proliferation und Zellüberleben	84
6.2	Migration und Adhäsion	86
6.3	Zelldifferenzierung.....	89
6.4	Cytoskelettale Reorganisation.....	94
6.5	Synaptogenese und Lernen	98
6.6	ERK-Signalweg	100
6.7	Oligodendrocytenreifung <i>in vivo</i>	104
6.8	Zusammenfassende Bewertung und Relevanz.....	108

7	Ausblick	113
8	Zusammenfassung	114
9	Referenzen	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln des linearen NP und der Isomere NP65, NP111 und NP112	3
Abbildung 2: Strukturformel des 17 β -Östradiols	9
Abbildung 3: Die Signaltransduktion von E2 und NP als endokriner Disruptor	12
Abbildung 4: Der Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>) als Modellorganismus	19
Abbildung 5: Zellviabilität von B35-Zellen unter Einfluss von NP	51
Abbildung 6: Proliferationsrate von B35-Zellen unter Einfluss von NP	53
Abbildung 7: Der Einfluss von NP auf die Neuritenlänge von B35-Zellen	56
Abbildung 8: Der Einfluss von NP auf die Neuritenanzahl von B35-Zellen	57
Abbildung 9: Der Einfluss unterschiedlicher NP-Isomere nach drei Tagen Inkubation auf die Neuritenlänge von B35-Zellen	59
Abbildung 10: Der Einfluss unterschiedlicher NP-Isomere nach 11 Tagen Inkubation auf die Neuritenlänge von B35-Zellen	61
Abbildung 11: Der Einfluss von NP auf die Neuritenlänge DiI-gefärbter Kleinhirnneuronen	63
Abbildung 12: Der Einfluss von NP auf die Wundbreite des B35-Monolayers im Scratch-Assay	64
Abbildung 13: Der Einfluss von NP auf das Adhäsionspotential von B35-Zellen	65
Abbildung 14: Der Einfluss von NP auf die Bildung von Sphäroiden bei B35-Zellen	66
Abbildung 15: Der Einfluss von NP auf die Wanderung von B35-Zellen aus Sphäroiden	68
Abbildung 16: Der Einfluss von NP auf die cytokelettale Reorganisation von B35-Zellen	69
Abbildung 17: Der Einfluss einer Langzeitexposition mit NP auf die konstitutive ERK1/2-Expression in B35-Zellen	71
Abbildung 18: Der Einfluss einer Exposition mit 100 nM NP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in B35-Zellen	72
Abbildung 19: Der Einfluss einer Exposition mit 1 μ M NP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in B35-Zellen	73
Abbildung 20: Der Einfluss von NP auf die Ausbildung von Synapsen in Kleinhirnneuronen	75
Abbildung 21: Der Einfluss von NP auf die morphologische Entwicklung von Zebrafischen	77
Abbildung 22: Der Einfluss von NP auf dorsale Olig2:egfp exprimierende OPCs im Zebrafisch	79

Abbildung 23: Der Einfluss von NP auf dorsale CldnK(cyto):egfp exprimierende Oligodendrocyten im Zebrafisch.....	80
Abbildung 24: 96-Well Platte, Detailaufnahme und Längenverteilung von Zebrafischen der Linie CldnK(cyto):egfp	81
Abbildung 25: Zellproliferation im Rückenmark von Zebrafischen	82
Abbildung 26: Apoptose im Rückenmark von Zebrafischen	83
Abbildung 27: Die Interferenz von NP mit E2 führt zu Veränderungen im Nervensystem	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: chemisch-physikalische Eigenschaften von technischem NP	4
Tabelle 2: Konzentrationen von NP in verschiedenen menschlichen Geweben	8
Tabelle 3: Chemikalien	23
Tabelle 4: Geräte	25
Tabelle 5: Mikroskope	26
Tabelle 6: Software	27
Tabelle 7: Arbeitsmaterialien	27
Tabelle 8: Kits und Standards	28
Tabelle 9: Primärantikörper	29
Tabelle 10: Sekundärantikörper	29
Tabelle 11: Zelllinie	30
Tabelle 12: Gewebe	30
Tabelle 13: Transgene Fischlinien	30
Tabelle 14: Dauer und Art der Behandlung bei der Analyse der Neuritenlängen.....	39
Tabelle 15: Zusammensetzung von 10%igem Trenn- und Sammelgel der SDS-PAGE.....	45

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	1- β -D-Arabinofuranosylcytosin
APEOs	4-Alkylphenol Ethoxylate
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BBB	blood-brain barrier (Blut-Hirn-Schranke)
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca	Calcium
ca.	circa
CA1; CA3	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
CAAX	Signalsequenz am C-Terminus mit beliebiger aliphatischer Aminosäure (a) und Methionin, Serin, Alanin, Cystein oder Glutamin (x). Dient der Membranverankerung
CAM	cell adhesion molecules (Zelladhäsionsmoleküle)
CAR	constitutive androstane receptor (konstitutiver Androstan-Rezeptor)
c-Caspase	cleaved Caspase
CldnK	Claudin K
CREB	cAMP response element binding protein
db	Dibutyl
DG	Gyrus dentatus
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DIV	days <i>in vitro</i> (Tage in Kultur)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DONALD	DOrtmund Nutritional and Anthropometric Longitudinally Designed Study
dpf	days post-fertilization (Tage nach der Fertilisation)
DTT	Dichlordiphenyltrichlorethan
E2	17 β -Östradiol
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
EDCs	endocrine disrupting chemicals (endokrine Disruptoren)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EE2	17 α -Ethinylöstradiol
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)

eGFP	enhanced green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
ER	Östrogenrezeptor
ERE	estrogen response element (Östrogen-responsives Element)
ER-E	Östrogenrezeptor-Östrogen-Komplex
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
ERK	extracellular-signal regulated kinase (extrazellulär Signal-regulierte Kinase)
F1	Filial-Generation
Fbxw7	F-Box and WD repeat domain-containing 7
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
GnRH	Gonadotropin-releasing-hormone
GPR30	G protein-coupled receptor 30 (G Protein-gekoppelter Rezeptor 30)
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HS	horse serum (Pferdeserum)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kontr.	Kontrolle
LD	letale Dosis
LTD	long-term depression (Langzeitdepression)
LTP	long-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
MAP2	microtubuli-associated protein 2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogenaktivierte Proteinkinase)
MBP	myelin basic protein (Myelin-basisches Protein)
MetOH	Methanol
miRNA	Mikro-RNA
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MS-222	Ethyl-3-Aminobenzoatmethansulfonat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NCAM	neurales Zelladhäsionsmoleküö
NeuN	Neuronal Nuclei
NGF	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
NOEC	no observed effect concentration (Konzentration ohne beobachteten Effekt)

NP	Nonylphenol(e)
NPEOs	Nonylphenoethoxylat(e)
ns	nicht signifikant
NVS	Nationale Verzehrsstudie
Olig2	oligodendrocyte transcription factor 2 (Oligodendrocyten-Transkriptionsfaktor 2)
OP	Octylphenole(e)
OPCs	oligodendrocyte progenitor cells (Oligodendrocyten-Vorläuferzellen)
P3/4	postnatale Tage drei bis vier
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCB	polychlorierte Biphenole
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
p-ERK	phosphorylierte extrazellulär Signal-regulierte Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
pMN	primary motor neuron (primäre Motorneuronen)
PMP22	peripheres Myelin-Protein 22
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PTU	N-Phenylthiourea
PXR	Pregnan X Rezeptor
R	Risikosatz
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma (kleines G-Protein)
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNA Pol II	DNA-abhängige RNA-Polymerase II
RIPA	Radioimmunoprecipitation-Assay Lysepuffer
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RXR	Retinoid X Rezeptor
S	Sicherheitssatz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SGZ	Subgranuläre Zone
SHC	Src homology 2 domain containing protein

SOS	Son Of Sevenless (Adapter-Protein)
TBP	TATA-Bindeprotein
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TDI	tolerable daily intake (tolerierbare tägliche Zufuhrmenge)
TF	Transkriptionsfaktor
TM	transmembran
TNFA	Tumor-Nekrose-Faktor- α
WB	Westernblot
x	-fach
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens 1

Einheitenverzeichnis

°C	Grad Celsius
g	gravity (Erdbeschleunigung)
g/Mol	Gramm pro Mol
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
L	Liter
log KOW	logarithmischer n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
cm ²	Quadratcentimeter
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mg/L	Milligramm pro Liter
µg	Mikrogramm
µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm
µg/kg KG/Tag	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag
µg/L	Mikrogramm pro Liter
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
mol wt	molecular weight (Molgewicht)
ng	Nanogramm
ng/g	Nanogramm pro Gramm
ng/mL	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
Pa	Pascal
Px	Pixel
v/v	volume/volume (Volumenprozent)
w/w	weight/weight (Massenprozent)
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Einführung und Problemstellung

Im Zuge der Industrialisierung der letzten Jahrzehnte sehen sich Mensch und Umwelt immer größeren Belastungen durch den Eintrag naturfremder Stoffe ausgesetzt. Dabei steigt nicht nur die Anzahl der synthetisierten Substanzen selbst, sondern auch deren Produktionsmenge kontinuierlich an (Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2018). Ökochemische und toxikologische Forschungen konnten dabei helfen, die Umweltbelastung durch besonders schädliche Substanzen wie polychlorierte Biphenole (PCB) oder Pestizide wie Dichlordiphenyltrichlorethan (DTT) weitestgehend einzudämmen. Seitdem rückt die Untersuchung des Verhaltens anderer xenobiotischer Substanzen immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Vor allem die Erforschung von Stoffen mit hormonähnlicher Wirkung wird seitdem stark vorangetrieben. Diese so genannten endokrinen Disruptoren (endocrine disrupting chemicals = EDCs) können pharmazeutischen (Kontrazeptiva), natürlichen (Phytoöstrogene) oder anthropogenen (Xenoöstrogene) Ursprungs sein (Frye *et al.*, 2012; Couleau *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Obwohl ihr hormonähnliches Potential deutlich geringer ausfällt als das der natürlichen Hormone, werden sie aufgrund ihrer Persistenz, Akkumulation in Umwelt und Geweben sowie Synergien mit anderen Substanzen als sehr problematisch erachtet (Soares *et al.*, 2008; Ying *et al.*, 2002). Ein weit verbreitetes Xenoöstrogen ist das technische Nonylphenol (NP), welches als Intermediär- und Abbauprodukt des industriell synthetisierten Nonylphenolethoxylats (NPEO) vorkommt, was ein breites Anwendungsspektrum hat. Man findet hohe Konzentrationen vor allem in Ballungsgebieten mit starker Wasserverschmutzung und in der Nähe von Kläranlagen. Die durch Labortests ermittelten Grenzwerte der „no observed effect concentration“ (NOEC) werden hierbei häufig überschritten (Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2018). NP selbst sind dabei unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch Mikroorganismen nur schwer abbaubar und persistieren in Sedimenten von Oberflächenwässern (Giger *et al.*, 1981; Marcomini *et al.*, 1990; Ying *et al.*, 2002). In Bezug auf Abbauewege des NP in Kläranlagen gibt es bislang nur wenig konsistente Daten zu Mineralisierungsgeschwindigkeiten und Abbauraten, da eine Halbwertszeit zwischen einigen wenigen bis hin zu fast 100 Tagen ermittelt wurde (Gabriel *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2011; Ying & Kookana, 2005). Die Abbaurate von NP konnte durch pH-Wert, Temperatur, Aluminiumsulfat, Acetat, Pyruvat, Lactat, Hefezusätze und andere experimentelle Parameter beeinflusst werden, insgesamt kann

aber proklamiert werden, dass NP als schwer abbaubar eingestuft werden müssen (Mao *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009b). Aus diesem Grund werden NP in der Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union (EU) seit dem Jahre 2000 als „prioritär gefährlicher Stoff“ geführt (RICHTLINIE 2000/60/EG).

Die Entdeckung von Soto *et al.*, dass NP in der Lage sind, die Wirkung von 17 β -Östradiol (E2) nachzuahmen, ließ das Interesse an dieser Substanzklasse in den 1990er Jahren sprunghaft ansteigen (Soto *et al.*, 1991). Seitdem mehren sich Hinweise, dass NP auch negative Auswirkungen auf die Entwicklung des Nervensystems und die synaptische Plastizität aufweisen. Für die meisten NP-Metabolite wurde der Einfluss auf den Menschen (besonders in Bezug auf das Nervensystem) bislang jedoch nicht hinlänglich untersucht.

1.2 Struktur und Eigenschaften von NP

4-Alkylphenol Ethoxylate (APEOs) gehören zur Gruppe der nichtionischen Tenside. Der Begriff Tensid umfasst dabei oberflächenaktive Substanzen, die Mizellen in wässriger Lösung bilden können (Raecker *et al.*, 2011; White *et al.*, 1994; Ying *et al.*, 2002). In APOEs bestimmt die Polyethoxylatkette aus 1 bis 40 Einheiten den hydrophilen Charakter, wohingegen die hydrophoben Eigenschaften durch das Alkylphenol mit verzweigten Kohlenstoffketten aus acht, neun oder 12 Kohlenstoffatomen hervorgerufen werden (Thiele *et al.*, 1997). Die technische Synthese von APOEs beginnt mit der Friedel-Crafts-Alkylierung von Phenol mit Trimethylpenten, wodurch 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol (*p*-*tert*-Octylphenol = OP) entsteht; oder mit der Alkylierung von Phenol mit einer Mischung aus Nonen-Isomeren, um 4-Nonylphenol in einem säurekatalysierten Prozess zu erhalten. Die chemische Zusammensetzung aus technischem Nonen führt zu einer komplexen Mischung von NP bestehend aus isomeren Komponenten mit verschiedenartig verzweigten Strukturen der NP-Seitenketten (Acir & Guenther, 2018; Thiele *et al.*, 1997). NP sind daher eine Gruppe chemischer Verbindungen mit aromatischem Ring, Hydroxylgruppe und Nonylseitenkette, wobei technisches NP hauptsächlich aus einer Mischung isomerer *para*-substituierter Phenole mit unterschiedlich verzweigten Nonylseitenketten besteht (ca. 80-90 %). Weiterer Bestandteil sind entsprechende *ortho*-substituierte Phenole (ca. 5-10 %) (Bhatt *et al.*, 1992; Wheeler *et al.*, 1997). Einzelne Isomere konnten bereits chemisch synthetisiert und isoliert werden (Acir *et al.*, 2016; Boehme *et al.*, 2010; Thiele *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und von Herrn Professor Klaus Günther zur Verfügung

gestellten Isomere NP65, NP111, NP112 sowie das lineare 4-*n*-NP sind mit ihren Strukturformeln in Abbildung 1 dargestellt.

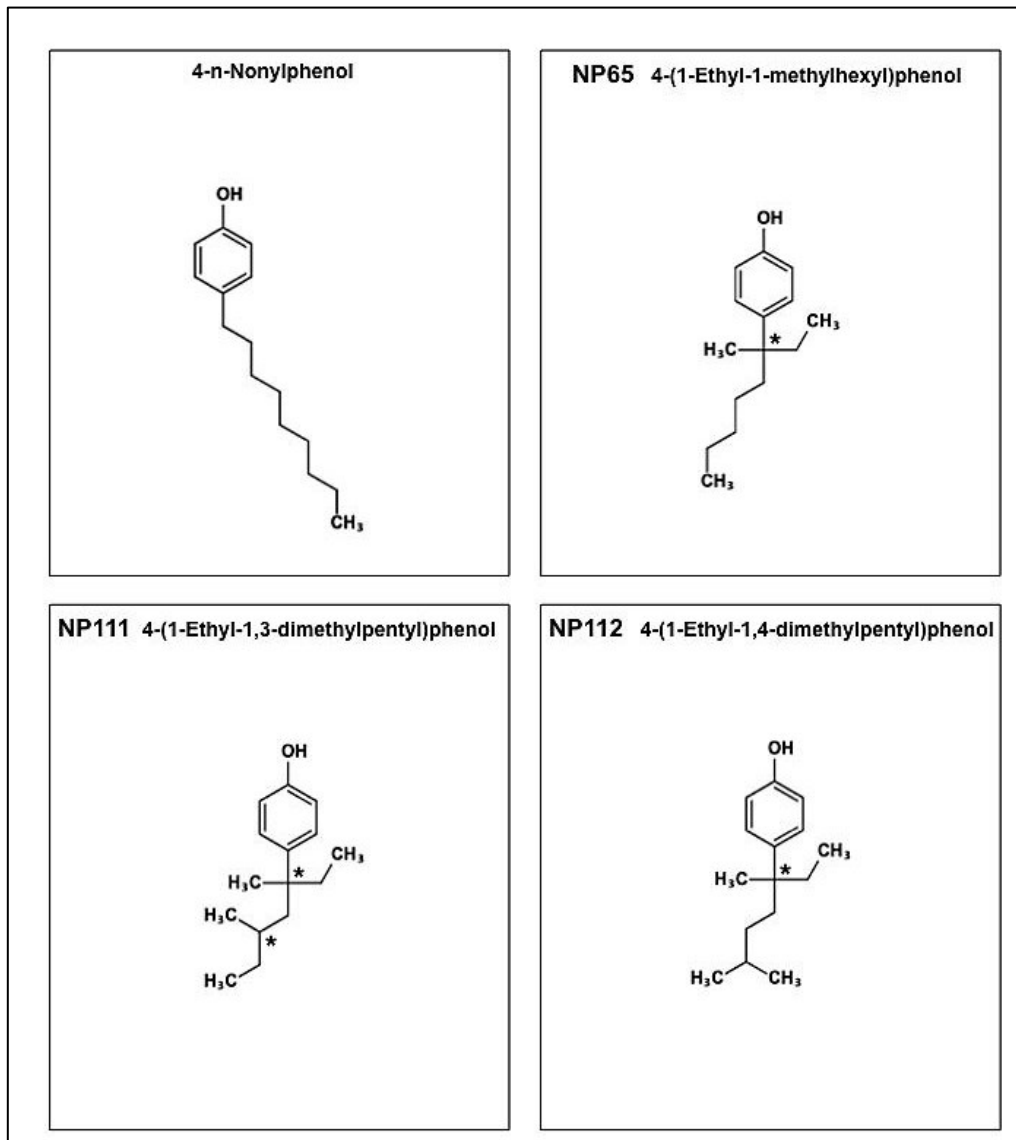


Abbildung 1: Strukturformeln des linearen NP und der Isomere NP65, NP111 und NP112 (eigene Darstellung)

IUPAC-Namen und Nomenklatur gemäß Juelich-Nomenklatur (Guenther *et al.*, 2006). *markieren Chiralitätszentren.

Es ist bedeutsam, dass unterschiedliche Verzweigungsmuster der Alkylketten einen Einfluss auf die biologischen und biochemischen Eigenschaften der Isomere haben können. Bei der Erfassung der chemisch-physikalischen Eigenschaften des technischen NP (s. Tabelle 1) ist darauf hinzuweisen, dass die genaue Zusammensetzung der technischen Mischung je nach Hersteller variieren kann. Es handelt sich in jedem Falle um ein Gemisch aus mehr als

20 NP-Isomeren, wobei 211 Konstitutionsisomere und bei Hinzuziehung der Enantiomere 550 Strukturen theoretisch möglich sind (Acir *et al.*, 2016; Guenther *et al.*, 2006).

Tabelle 1: chemisch-physikalische Eigenschaften von technischem NP

Name	Eigenschaft	Referenz
Aussehen	viskose, blassgelbe Flüssigkeit, leicht phenolischer Geruch	(Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2014)
Molare Masse	220,34 g/Mol (C ₁₅ H ₂₄ O)	(European Union Risk Assessment Report, 2002)
Wasserlöslichkeit	4,92 ± 0,31 [mg/L] (bei 10 °C) 6,35 ± 0,10 [mg/L] (bei 25 °C)	(Ahel & Giger, 1993)
Dampfdruck	0,3 [Pa] (bei 25 °C) 2,66 [kPa] (bei 180 °C)	(European Union Risk Assessment Report, 2002)
Siedepunkt	290-300 °C	(Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2014)
Schmelzpunkt	ca. -8 °C	(Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2014)
Dichte	0,95 (bei 20 °C)	(European Union Risk Assessment Report, 2002)
Verteilungskoeffizient log K _{ow}	4,48 ± 0,12	(European Union Risk Assessment Report, 2002)
Besondere Gefahren	R22 (gesundheitsschädlich beim Verschlucken) R34 (verursacht Verätzungen) R50-53 (sehr giftig für Wasserorganismen; kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben)	(European Union Risk Assessment Report, 2002)

1.3 Vorkommen und Eintrag in die Umwelt

Der Haupteinsatz von NP ist der als intermediäres Produkt bei der Herstellung von NPEOs. Im Jahre 1997 produzierten innerhalb der EU nur vier Unternehmen NP. Dabei lag das Produktionsvolumen jedoch bei 73.500 Tonnen pro Jahr, wobei zusätzlich 8.500 Tonnen pro Jahr importiert wurden (European Union Risk Assessment Report, 2002). Weltweit werden heute ca. 10.000 bis 100.000 Tonnen jährlich produziert (Europäische Chemikalienagentur (ECHA), 2018). Wegen ihrer guten Tensidwirkung haben NPEOs ein breites Anwendungsspektrum als Formulierungshilfsstoffe (Emulgatoren, Netzmittel), Bestandteil

von chemischen Pflanzenschutzmitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln, Farben und Lacken, sowie als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Polymeren und Klebstoffen. NPEOs werden ebenfalls in der Textil-, Leder- und Papierherstellung eingesetzt (Thiele *et al.*, 1997). Sie gelten insgesamt als kostengünstig und im Vergleich zu anderen nicht-ionischen Tensiden als sehr leistungsstark, was erklärt, dass sie bereits seit gut 40 Jahren in einer Vielzahl von Prozessen eingesetzt werden. Nachdem NP in der Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und Rates als „prioritär gefährlicher Stoff“ eingestuft wurden, legte die Kommission Vorschläge für die Begrenzung dieser Substanzklasse vor (RICHTLINIE 2000/60/EG). Im Zuge eines freiwilligen Selbstverzichts bezüglich des Einsatzes von NPEOs in Detergenzien im Jahre 2003 ist der Verbrauch an NP innerhalb der EU in den letzten Jahren kontinuierlich gesunken (RICHTLINIE 2003/53/EG). Industrieabwässer machen jedoch weiterhin die Majorität des Eintrags von NP in die Umwelt aus. Konzentrationen innerhalb von Kläranlagen liegen prinzipiell in geringen $\mu\text{g/L}$ Bereichen, jedoch wurden auch Konzentrationen von mehr als $129 \mu\text{g/L}$ ermittelt (Klecka *et al.*, 2010). Die Bereinigung von NP in Kläranlagen ist dabei sehr variabel und liegt zwischen 9 und 94 %, je nach Region und Art der Prozesseinheiten (Soares *et al.*, 2008). Zusätzlich können NP jedoch während der Klärung von Abwässern entstehen, indem NPEOs leicht zu 4-NP abgebaut werden. Höhere Konzentrationen von NP werden deshalb häufiger in Abwässern, als in Zuflüssen zu Kläranlagen gefunden (Farré *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2008). Die langsame biologische Transformation der höheren Oligomere führt dazu, dass ausgeleitete Produkte wegen ihres lipophilen Charakters teilweise eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanzen. Weiterhin konnten Untersuchungen mit dem Mikroorganismus *Sphingobium xenophagum* Bayram zeigen, dass durch den Abbau von NP hochgradig Östrogen-wirksame Isomere durch *ipso*-Substitutionen entstehen (Gabriel *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2008). Es ist eindeutig nachgewiesen, dass auch heute noch verschiedenste NP-Metabolite in vielen umweltrelevanten Matrices vorkommen (z. B. Fluss-, See-, Oberflächen- und Grundwasser; Sedimente, Ackerböden) (Araujo *et al.*, 2017; Loos *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2008; Thiele *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 2002). Die höchsten Konzentration konnten dabei in China ermittelt werden ($148,85 \text{ nM}$), wobei auch in Deutschland, wo im Zuge des freiwilligen Selbstverzichts der EU der Eintrag von NP in die Umwelt kontinuierlich reduziert wurde, auch nach Umsetzung der Richtlinie noch Werte zwischen $0,60$ bis $5,5 \text{ nM}$ in Rhein, Elbe, Main, Oder und der Nordsee gemessen werden konnten (Bester *et al.*, 2001; Fries & Puttmann, 2003; Wu *et al.*, 2007). Eine Konsequenz des weltweiten Gebrauchs der Chemikalie ist deshalb neben deren diffuser Verbreitung in Umweltmatrices auch eine

Kontamination von Lebensmitteln und Trinkwasser, denen Menschen unmittelbar ausgesetzt sind. Dies wurde besonders ausführlich von Günther et al. nachgewiesen (Guenther *et al.*, 2002; Guenther *et al.*, 2006; Guenther *et al.*, 2017; Raecker *et al.*, 2011). Eine Untersuchung von 24 Lebensmittelgruppen ergab NP-Werte zwischen 0,1 bis 19,4 µg/kg Frischgewicht mit besonders hohen Werten in Tomaten und Äpfeln. Mithilfe der Nationalen Verzehrsstudie I (NVS I) und Dortmund Nutritional and Anthropometric Longitudinally Designed (DONALD) Studie ließ sich eine tägliche Aufnahme für Erwachsene von 0,1 µg/kg KG/Tag ($\approx 7,5$ µg/Tag) und für Säuglinge von 0,23 bis 0,65 µg/kg KG/Tag ($\approx 1,4$ µg/Tag) postulieren (Guenther *et al.*, 2002). Die durchschnittliche kalkulierte Aufnahme über Plastikflaschen mit Trinkwasser beträgt demnach ca. 0,36 bis 0,60 µg/Tag (Careghini *et al.*, 2015). Eine vergleichbare Studie aus Taiwan, mit dort üblich verzehrten Lebensmitteln, wies besonders hohe Konzentrationen von NP in Lachs (123,8 ng/g) und Austern (235,8 ng/g) nach (Lu *et al.*, 2007). In Asien, Europa, und Nordamerika wurde von hohen Konzentrationen in Meeresfrüchten berichtet (Basheer *et al.*, 2004; Dodder *et al.*, 2014; Ferrara *et al.*, 2008) und auch Gemüse und Früchte aus Spanien und Schweden sind mit Werten zwischen 5 und 50 µg/kg Frischgewicht belastet. Hier waren vor allem Gemüse betroffen, die in Plastikfolien verpackt waren (Cacho *et al.*, 2012; Gyllenhammar *et al.*, 2012). Insgesamt waren die Konzentrationen an NP in Lebensmitteln jedoch nicht von deren Fettgehalt abhängig und konnten potenziell in diversen Prozessschritten eingebracht werden. Diese Lebensmittel gelangen jedenfalls über den Importweg auch nach Deutschland. Studien, inwieweit sich der Gehalt von NP in heimischen Lebensmitteln in den letzten Jahren reduziert hat, stehen aus. Allerdings ist daneben auch die Aufnahme von NP über die Haut durch importierte Textilien aus dem asiatischen Raum nicht zu unterschätzen. Dass der Kontakt von Menschen mit NP nicht ohne Folgen bleiben kann, ist insofern nicht verwunderlich. NP sind in diversen menschlichen Geweben nachgewiesen worden. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 1.4 genauer erläutert.

1.4 Metabolismus von NP

Obschon die Persistenz von NP hinlänglich belegt ist, sind weitergehende Untersuchungen, die den Abbauweg des NP im Organismus beschreiben, bislang eher selten. Uneinheitlich ist dabei auch die Verwendung der NP-Referenzsubstanzen in Hinblick auf deren Isomerenzusammensetzung. Häufig wird das kommerzielle lineare 4-*n*-NP als Modellsubstanz herangezogen, welches so in der Umwelt nur in Spuren vorkommt (Calafat *et al.*, 2005) und deshalb wenig Relevanz hat. Teilaspekte des metabolischen Verhaltens von NP

sind in einigen Pflanzen und Tieren untersucht worden, die einzige Studie mit menschlichen Probanden beschreibt die pharmakokinetische Wirkung von NP und liegt bereits 20 Jahre zurück (Mueller *et al.*, 1998). In Pflanzenzellsuspensionen von *Agrostemma githago* wurde nach sieben Tagen Inkubation mit 4-NP mehr als 85 % in die Kornrade aufgenommen und 40 % zu Metaboliten verstoffwechselt, deren Seitenkette monohydroxyliert war (Schmidt *et al.*, 2003). Bei freiwilligen menschlichen Probanden wurde nach einer einmaligen oralen (5 mg) oder intravenösen Gabe (1 mg) von ¹³C-markiertem NP eine schnelle exponentielle Konzentrationsabnahme im Blut mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden verzeichnet. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation lag bei 20 % und die Verteilung erfolgte innerhalb von zwei Stunden in die lipophilen Kompartimente des Körpers. 10 % wurden als Ausgangssubstanz oder einfaches Konjugat im Kot und Urin der Probanden wiedergefunden (Mueller *et al.*, 1998). Mittlerweile sind NP und ihre Derivate in den unterschiedlichsten Kompartimenten, Geweben und Flüssigkeiten des menschlichen Körpers nachgewiesen worden. Die Konzentrationen in humanen Blutproben rangieren zwischen Werten unterhalb der Detektionsschwelle bis hin zu 68,5 nM im Blutserum und 984 nM im Plasma (Chen *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2000; Shekhar *et al.*, 2017; Tan & Ali Mohd, 2003). Weiterhin gibt es diverse Studien, welche den Gehalt von NP im Urin koreanischer, chinesischer und taiwanesischer Populationen untersucht haben (Chen *et al.*, 2005; Park & Kim, 2017; Xiao *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). Hier lagen die Werte zwischen 2,77 und 42,06 ng/mL.

Da das NP einen log K_{OW} Wert von 4,48 und eine geringe Wasserlöslichkeit hat, akkumuliert es vorwiegend in organischem Material und wird in hohen Konzentrationen im menschlichen Fettgewebe gefunden. Müller *et al.* detektierte es in 25 Fettgewebsproben von Schweizern mit einer medianen Konzentration von 27 ng/g (Mueller *et al.*, 1998). Eine andere Arbeitsgruppe analysierte Proben aus Spanien und fand dort NP-Werte von 260 nM (Lopez-Espinosa *et al.*, 2009), im Jahre 2011 wurden in Fettgewebsproben einer italienischen Kohorte Konzentrationen von durchschnittlich 122 ng/g verzeichnet (Ferrara *et al.*, 2011).

Besonders bedenklich ist, dass NP auch in Muttermilch mit Werten zwischen 0,07 bis 32,00 ng/mL gefunden wurden (Ademollo *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Guenther *et al.*, 2002). Die höchsten Konzentrationen wies eine italienische Kohorte auf, bei der in der Spitze Werte von 56 µg/L ermittelt wurden (Ademollo *et al.*, 2008). Die Gruppe um Ademollo postuliert, dass bei einer alleinigen Ernährung eines Säuglings über Muttermilch von ihm

täglich bis zu 3,94 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$ aufgenommen werden, was der tolerierbaren täglichen Zufuhrmenge (TDI – tolerable daily intake) von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$ sehr nahe komme.

Dass die Plazenta keinen Schutz des Embryos vor der Umweltchemikalie bietet, zeigten Huang und Kollegen im Jahre 2014. Sie detektierten NP in Nabelschnurblut und Plazentagewebe mit Werten von 18,8 ng/mL bzw. 19,8 ng/g, was eine Partizipation des Embryos bedeuten könnte (Huang *et al.*, 2014). Auch andere Arbeitsgruppen hatten dies in früheren Jahren bereits nachgewiesen (Chen *et al.*, 2008; Balakrishnan *et al.*, 2011; Tan & Ali Mohd, 2003). Im Jahre 2017 analysierten Forscher mittels Gas-Chromatographie, ob NP auch im Fruchtwasser von Frauen präsent sind, welches der Fötus trinkt, und fanden hier Werte von 9,38 ng/mL (Shekhar *et al.*, 2017). Die Exposition der Mütter mit NP ist also positiv mit dem Auftreten von NP-Spuren *in utero* assoziiert.

Zusammenfassend konnten die Untersuchungen zeigen, dass sich die Werte von NP bei einzelnen Populationen sowie je nach Analysemethoden und Matrices stark unterscheiden. Durchschnittliche Werte für NP-Konzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten sind der Vergleichbarkeit halber in Tabelle 2 als nanomolare Konzentrationen angegeben.

Tabelle 2: Konzentrationen von NP in verschiedenen menschlichen Geweben

Matrix	Konzentrationen	Referenz
Blutplasma	984 nM	Chen <i>et al.</i> , 2008
Blutserum	69 nM	Tan & Ali Mohd, 2003
Fettgewebe	260 nM	Lopez-Espinosa <i>et al.</i> , 2008
Fruchtwasser	43 nM	Shekhar <i>et al.</i> , 2017
Gehirn	0,04 nM	Geens <i>et al.</i> , 2012
Muttermilch	145 nM	Ademollo <i>et al.</i> , 2008
Nabelschnurblut	69 nM	Tan & Ali Mohd, 2003
Plazentagewebe	89 nM	Huang <i>et al.</i> , 2014
Urin	126 nM	Xiao <i>et al.</i> , 2011

1.5 NP als hormonähnlicher Stoff

Endogene Steroidhormone führen in der frühen kritischen Phase der Entwicklung zu sexuellen Dimorphismen in Gehirn und Verhalten und einer geschlechtsspezifischen Signalantwort auf Hormone in späteren Entwicklungsstadien (McCarthy *et al.*, 2009; Panzica *et al.*, 1995). Das fein tarierte Gleichgewicht kann durch eine steigende Anzahl von Kontaminanten aus der Umwelt, denen das Individuum ausgesetzt ist, aus der Balance geraten. Hormonahnliche Stoffe können an verschiedenen Stellen der Wirkungskaskade

endogener Hormone eingreifen. Sie ändern dabei beispielsweise die Serumlipidkonzentrationen oder Enzyme des Metabolismus, die für die Konvertierung von Cholesterol zu Steroidhormonen notwendig sind. Weiterhin können sie ihre Wirkung über klassische Steroidrezeptoren (oder unabhängig von ihnen) vermitteln, indem sie die Effekte endogener Steroide (Androgene oder E2) nachahmen, antagonisieren oder ändern (Bonfeld-Jorgensen *et al.*, 2007). Diese Effekte stellen, isoliert betrachtet, noch keine Schädigung des Organismus dar, können jedoch als Vorstufe zu Schadwirkungen interpretiert werden. Die aus einer Exposition mit EDCs resultierenden Folgen können vielfältig sein und reichen von malignen Veränderungen über Fertilitätsstörungen, Schwächung des Immunsystems bis hin zu Schädigungen des zentralen Nervensystems (Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Koprass *et al.*, 2014; Kusunoki *et al.*, 2008; Miles-Richardson *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2001). Im Falle des NP werden dabei zumeist Effekte beobachtet, die denen der Gruppe der natürlichen Östrogene ähneln. Abbildung 2 zeigt die Strukturformel des natürlichen Hormons E2.

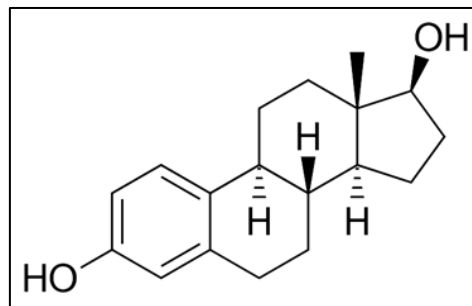


Abbildung 2: Strukturformel des 17β-Östradiols (eigene Darstellung nach (Brufani *et al.*, 2017))

Die Wirkung des natürlichen Hormons kann von NP nachgeahmt werden, indem NP an Östrogenrezeptoren binden.

Aufgrund des Wirkungsmechanismus, der in Ligand-Rezeptor-Interaktion konvergiert, können viele hervorgerufene Effekte als reversibel bezeichnet werden. Allerdings kommen auch langfristige Effekte durch transkriptionelle Modulationen und epigenetische Veränderungen in Betracht. Die östrogenen Eigenschaften von p-alkylierten phenolischen Substanzen wurden bereits 1937 entdeckt (Dodds & Lawson, 1938), vor gut 40 Jahren konnte erstmals beschrieben werden, dass p-alkyliertes Phenol E2 vom Östrogenrezeptor (ER) verdrängt oder mit diesem synergisiert (Mueller & Kim, 1978). In den 1990er Jahren wurde dann berichtet, dass aus Polystyrol freigesetztes p-NP in der Lage ist, die Zellproliferation und den Progesteronrezeptor von östrogensensitiven MCF-7 Brustkrebszellen zu induzieren (Soto *et al.*, 1991). Die Abschätzung der östrogenen Potenz mithilfe von sensitiven Zellkulturen, die auf Exposition von hormonähnlichen Substanzen mit Zellteilung reagieren, wird als E-Screen

bezeichnet und fand seitdem häufig Anwendung (Gutendorf & Westendorf, 2001; Preuss *et al.*, 2006). Auch andere Methoden wie Luciferase-Reporter Assays und zellfreie kompetitive Bindungsassays mit rekombinanten menschlichen ER wurden für die Bewertung von möglichen pathophysiologischen Effekten endokriner Disruptoren herangezogen (Gutendorf & Westendorf, 2001; Paech *et al.*, 1997; Ter Veld *et al.*, 2008). Ebenfalls eingesetzt werden genetisch veränderte, östrogensensitive Hefezellen (rekombinante *Saccharomyces cerevisiae*) im so genannten Yeast-Screen (Kim *et al.*, 2004; Shioji *et al.*, 2006). Bei *in vivo* Assays dienen aquatische Wirbeltiere wie Zebrafische, Regenbogenforellen und japanische Reisfische als Modellorganismen. Die Auswahl der Parameter richtet sich hierbei nach der untersuchten Organismusart. In männlichen Fischen erhöht NP die Plasmaspiegel von Vitellogenin, einem Protein, welches normalerweise nur in geschlechtsreifen Weibchen unter dem Einfluss von Östrogenen produziert wird (Verderame & Scudiero, 2017). Im Allgemeinen werden negative Effekte auf Wachstum, Embryonalentwicklung und Reproduktion in verschiedenen Fischarten nachgewiesen, die alle auf die hormonelle Wirkung von NP zurückgeführt werden (Kinch *et al.*, 2016; Saravanan *et al.*, 2019). In Säugetieren liegen ebenfalls bereits einige Daten vor, die einen Einfluss von geringen chronischen Konzentrationen von NP auf E2-Level und die Energiehomöostase im Reproduktionssystem weiblicher Ratten und Mäuse aufzeigen (Di *et al.*, 2018; Patino-Garcia *et al.*, 2018). Männliche Ratten, die neonatal mit E2 oder 500 mg/kg/KG/Tag NP behandelt wurden, zeigten Auffälligkeiten bei der Keimzellentwicklung, jedoch keine Veränderungen in ihrer Reproduktionsfähigkeit (Nagao *et al.*, 2000). Ergebnis all dieser vielfältigen Testverfahren ist die Erkenntnis, dass NP die Fähigkeit besitzen, an Progesteronrezeptoren und ER mit ihren Subtypen ER α und ER β und membrangebundenen ER (G protein-coupled receptor 30 - GPR30) zu binden, diese in kompetitiver Weise zu hemmen oder zu transaktivieren (Sato *et al.*, 2002). Dabei können sie eine rezeptorvermittelte Wirkung haben, die Aktivität des Rezeptors, der natürlichen Hormone oder deren Abbau verändern. Die relative Potenz von NP genormt auf E2 liegt hierbei je nach Organismus zwischen 10^{-6} und 10^{-3} (Jobling & Sumpter, 1993; Sonnenschein *et al.*, 1995), wobei sie mit einer höheren Affinität an den ER β binden (Gutendorf & Westendorf, 2001). Das bislang potenteste Isomer, welches im Yeast-Screen untersucht wurde, war NP93 mit einer Östrogenität, die nur 1690-fach geringer ausfiel als die des natürlichen Hormons und ungefähr doppelt so hoch wie die des technischen Gemisches. Obschon man die östrogene Wirkung aufgrund der unterschiedlichsten Isomeren-Zusammensetzungen in NP-Gemischen nicht pauschalisieren kann, lässt sich also konstatieren, dass NP eine östrogene Aktivität aufweisen, die ca. 1/1000 bis 1/10.000-mal geringer ist als die des natürlichen E2. Jedoch wurden im

menschlichen Blutplasma NP-Maximalkonzentrationen von bis zu 1250 nM (Chen *et al.*, 2005) und im Serum 68,84 nM (Tan & Ali Mohd, 2003) gefunden. Die Konzentrationen an E2 im Blut hingegen liegen nur zwischen 0,08 nM und 0,55 nM je nach Alter und Geschlecht (Ho *et al.*, 1987), also um den Faktor 10 bis 100 niedriger. Dies bedeutet, dass trotz der geringeren biologischen Aktivität von NP aufgrund ihrer höheren Konzentration im Blut mit einer Wirkung auf das steroidale System zu rechnen ist. Unterschiede im östrogenen Potenzial verschiedener NP-Isomere liegen dabei in ihrer chemischen Struktur. Die Alkylseitenkette und Anzahl der Kohlenstoffatome (C4-6) spielen dabei genauso eine Rolle wie die Art der Verzweigungen. Ein hoher Verzweigungsgrad an β - und γ -Kohlenstoffatomen, nicht jedoch an α -Kohlenstoffatomen, erhöhen die Östrogenität, wohingegen Isomere mit nur einem α -Substituenten ein geringeres östrogenes Potenzial aufweisen (Gabriel *et al.*, 2008; Shioji *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009a). Die einzelnen Isomere zeigten im E-Screen unterschiedliche östrogene Aktivität genormt auf E2 (Preuss *et al.*, 2006), konnten das mRNA-Expressionslevel von ER und Progesteronrezeptor erhöhen und das mRNA-Expressionslevel des Androgenrezeptors verringern (Liu *et al.*, 2016). Weiterhin inhibierten NP-Isomere die Testosteronfreisetzung von Leydig-Zellen über einen noch unbekanntem Mechanismus (Ying *et al.*, 2012). Die spezifische Aktivität der Isomere kann mit Unterschieden in ihrer Rezeptoraffinität, Rezeptoraktivierung oder Aktivierung/Deaktivierung von nicht-Rezeptor medierten Seitenwegen der Reporter-gen-Translation zusammenhängen (Preuss *et al.*, 2010). Im technischen Gemisch könnten somit auch noch nicht identifizierte Isomere oder Minorkomponenten unterschiedliche Signalwege anstoßen, so dass Isomer-spezifische Untersuchungen essentiell sind. Insgesamt gibt es vier verschiedene Wege, über die Östrogene wirken können. Eine einfache schematische Darstellung der Östrogensignalwege und der Wirkungen von NP findet sich in Abbildung 3. Beim klassischen, direkten genomischen Signalweg bewirkt die Bindung des E2 an die Rezeptoren ER α und ER β im Cytoplasma der Zielzellen eine Konformationsänderung. Diese ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors, die Translokation in den Zellkern und die Bindung an das Östrogen-Response-Element (ERE), welches in der Nähe von oder auf der Promotorregion des Zielgens liegt. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor fördert daneben auch die Rekrutierung verschiedener Co-Regulatoren in einen Komplex, der die Chromatinstruktur auflockert sowie die Rekrutierung der RNA Polymerase-II Transkriptionsmaschinerie. In diesem Fall agiert der Östrogen-ER-Komplex als transkriptioneller Aktivator der Genexpression (Vrtačnik *et al.*, 2014).

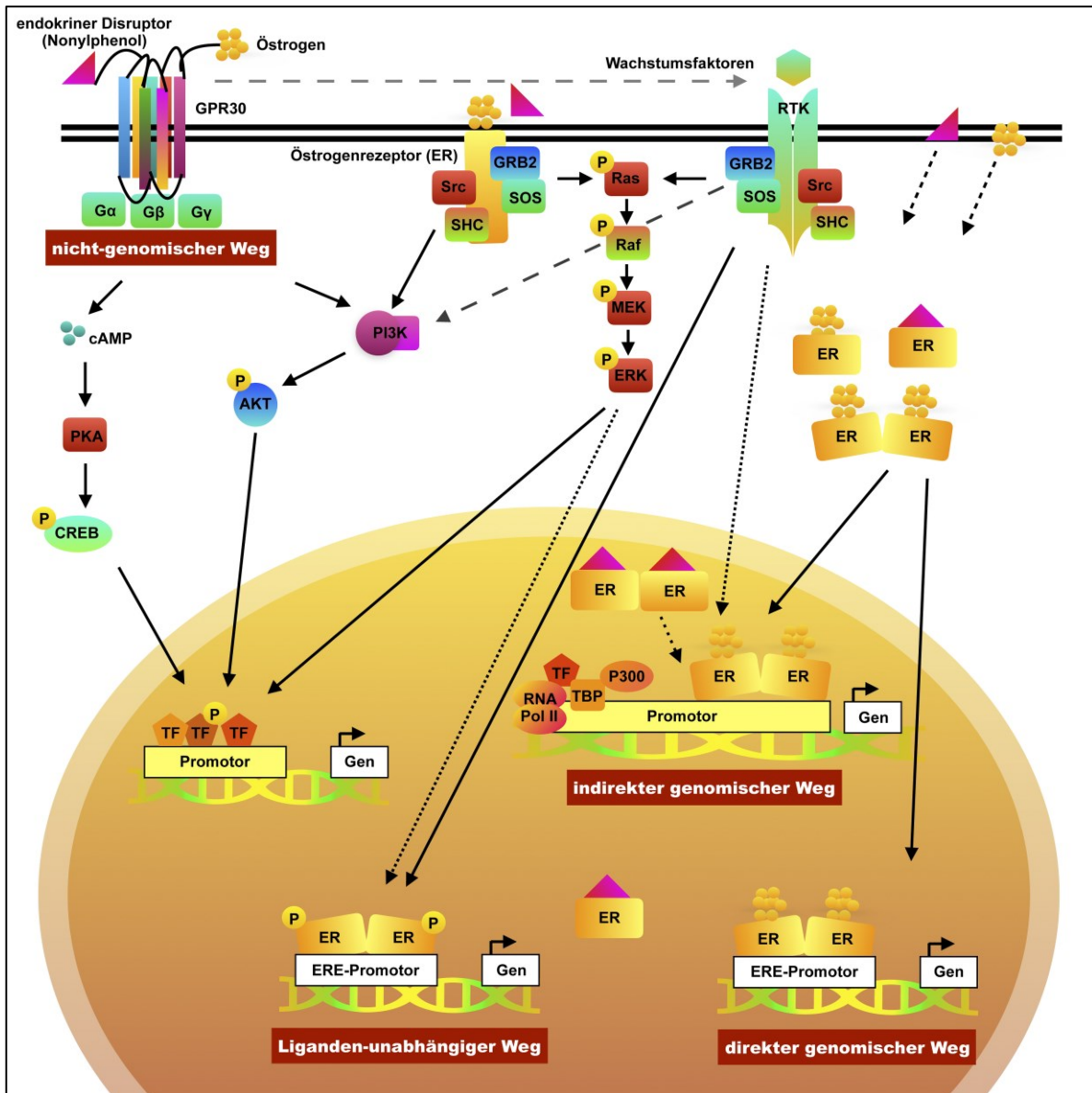


Abbildung 3: Die Signaltransduktion von E2 und NP als endokriner Disruptor (eigene Darstellung)

Der klassische genomische Signalweg des Östrogens hat verschiedene Zwischenschritte, welche die Bildung des Östrogenrezeptor-Östrogen-Komplexes (ER-E), Rezeptordimerisierung, Translokation in den Zellkern und Bindung an das Östrogenresponse-Element (ERE) beinhalten, was schließlich zu regulatorischen Änderungen der Transkription führt. Der ER-E kann über den indirekten genomischen Signalweg ebenfalls an Promotorregionen binden, die kein ERE tragen. Hier assoziieren zusätzlich Transkriptionsfaktoren (TF) wie P300, das TATA-Bindeprotein (TBP) und die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (RNA Pol II). Eine weitere Signalkaskade des Östrogens verläuft über die Interaktion membrangebundener ER mit anderen Rezeptortypen und vermittelt schnelle, nicht genomische Signalantworten. E2 bindet hierbei an den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR30), welcher seinerseits sowohl die Adenylatcyclase mit cAMP als 2nd Messenger, als auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) führt zur Bindung der Adapterproteine GRB2 und Src sowie Assoziation von SOS, so dass das kleine G-Protein Ras aktiviert werden kann, welches die MAP-Kinase-Kaskade initiiert. Die Bindung von Ras an Raf verändert dessen Struktur, worauf die Proteinkinase andere Proteine, wie die MEKs, phosphoryliert. Durch MEKs werden dann wiederum extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs) aktiviert. Die Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten durch die Proteinkinasen A (PKA) oder ERK-Kinase sowie andere extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren oder NP, können auch eine Liganden-unabhängige Aktivierung der ER nach sich ziehen. Das NP vermittelt über seine Bindung an ER diverse Signalwege. AKT – Proteinkinase B; CREB – cAMP response element binding protein; NP – Nonylphenol; P – Phosphat

Beim indirekten genomischen Signalweg kann E2 auch die Expression von Genen hervorrufen, die kein ERE in ihrer Promotorregion tragen. In diesem Fall binden die Ligand-aktivierten ER die DNA nicht direkt, sondern durch Protein-Proteininteraktionen mit anderen Klassen von Transkriptionsfaktoren (Vrtačnik *et al.*, 2014).

Es ist jedoch bereits lange bekannt, dass einige Östrogen-induzierte Änderungen zu rasch von statten gehen, als dass sie mit der Transkription von Zielgenen und anschließender Proteinbiosynthese assoziiert sein können. Eine weitere Signalkaskade des Östrogens verläuft über den membrangebundenen ER-Signalweg. Dieser führt vor allem zu kurzfristigen Regulationen innerhalb der Zelle, da er die Generierung des 2nd Messengers cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) über die Aktivierung der Adenylatcyclase (Aronica *et al.*, 1994), einen Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ (Beeler & Gable, 1993; Falkenstein *et al.*, 1999) und Aktivierung des Inositoltriphosphats (Le Mellay *et al.*, 1997) nach Bindung des E2 an den membrangebundenen ER veranlasst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Bindung ebenfalls die schnelle Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinase) (Migliaccio *et al.*, 1996), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase AKT hervorruft (Haynes *et al.*, 2000). GPR30 als 7-Transmembranhelix-Rezeptor vermittelt somit Wachstumsfaktor-ähnliche Effekte. Es wird dabei vermutet, dass die Bindung von E2 an nukleäre ER diese auch dazu veranlasst, an der Plasmamembran durch Protein-Protein-Interaktionen mit verschiedenen Rezeptortypen wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Glutamatrezeptoren zu interagieren und diese zu aktivieren. Die Konzentrationen, die zur Auslösung eines Effekts benötigt werden, sind hierbei vermutlich höher, als bei der Aktivierung des genomischen Signalwegs. In lipidreicher Gehirnumgebung kann Östradiol gespeichert und langsam freigesetzt werden und Testosteron kann lokal aromatisiert werden, wodurch die lokale Östradiolkonzentration in einen Bereich gebracht wird, der verschiedene Membran-ER-Prozesse stimuliert (Micevych *et al.*, 2008). Dies kann auch durch hohe Konzentrationen an östrogenwirksamen Substanzen wie NP ausgelöst werden. Neben genomischem und nicht-genomischem Signalweg können ER auch in Abwesenheit von E2 aktiviert werden. Die Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten durch die Proteinkinasen A (PKA) oder C (PKC) sowie andere extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren oder NP, können auch eine Liganden-unabhängige Aktivierung der ER nach sich ziehen (Vrtačnik *et al.*, 2014). Die molekularen Mechanismen, die dem Östrogen-Signalweg unterliegen, sind somit sehr vielfältig und hängen durch die Involvierung diverser stromabwärts oder aufwärts liegender Transduktionswege und -moleküle von einer großen

Anzahl von Zuständen innerhalb der Zelle ab, was auf einen Zelltyp-spezifischen Mechanismus schließen lässt. Dieselben Zielgene können also sowohl durch den genomischen, als auch nicht-genomischen und Ligand-unabhängigen Mechanismus aktiviert werden. Daneben können ein und dieselben Promotorsequenzen sowohl ERE tragen, als auch Response-Elemente, die mit anderen Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Die endgültige Genantwort hängt also von verschiedenen Faktoren ab, welche die Kombination von Transkriptionsfaktoren auf den Promotoren, Expressionslevel und zelluläre Lokalisation aller drei ER, deren zahlreiche Co-Regulatoren und Signalwegkomponenten und den jeweiligen Stimulus beinhalten (Marino *et al.*, 2006). Die Wirkungen, die durch NP hervorgerufen werden können, müssen also im zellulären Kontext betrachtet werden und können sich sowohl gegenseitig aufheben, als auch verstärken oder überlagern. Es können sich Effekte in Proliferation, Zellüberleben und -differenzierung, jedoch auch Eigenschaften wie veränderte Migration und Adhäsion durch NP-Exposition manifestieren.

1.6 Neurotoxische Effekte von NP

Von besonderer Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Fragestellung, ob NP in der Lage sind ihre Wirkungen unmittelbar im Gehirn zu vermitteln. Die Blut-Hirn-Schranke (BBB - blood-brain barrier), welche aus Endothelzellen und Astrocyten besteht, die Kapillaren und Venolen im Gehirn undurchlässig auskleidet, dient normalerweise als Schutz vor dem Eindringen schädlicher Substanzen aus dem Blut in das Gehirn. NP sind jedoch in der Lage diese BBB zu überwinden (Arukwe *et al.*, 2000; Doerge *et al.*, 2002). Geens *et al.* detektierten sehr geringe Konzentrationen von 4-*n*-NP in menschlichen Gehirnproben (0,04 nM), allerdings ist hier zu beachten, dass die lineare Form der NP in den meisten Mixturen nur in geringen Konzentrationen vorkommt (Calafat *et al.*, 2005; Geens *et al.*, 2012) und aus diesem Grund die tatsächliche Konzentration im menschlichen Gehirn aufgrund der Datenlage unterschätzt werden könnte. In einer Studie von Kazemi *et al.* wurden Ratten 0,2 mg/kg oder 2 mg/kg NP für 36 Tage oral appliziert. Die HPLC- (high performance liquid chromatography) Analyse zeigte, dass besonders hohe Konzentrationen in der Amygdala und im Hippocampus akkumulierten (Kazemi *et al.*, 2018). Sofern davon auszugehen ist, dass das NP seine Wirkungen im Gehirn durch Interaktion mit dem steroidalen System vermittelt, müssen auch die entsprechenden ER dort zu finden sein. Im Gehirngewebe ist in der Tat eine besonders hohe Expression von ER β zu beobachten, an den das NP in Bindungsassays mit erhöhter Affinität bindet (Kuiper *et al.*, 1997). Die

Studienlage zeigt, dass Metabolite von NP in der Lage sind, mit dem Nervensystem zu interagieren (Couderc *et al.*, 2014; Jie *et al.*, 2010; Jie *et al.*, 2013a) und die kognitive Funktion zu beeinflussen (Kawaguchi *et al.*, 2015a; Kazemi *et al.*, 2018; Kudo *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2017; Litwa *et al.*, 2014, 2016; Mao *et al.*, 2011). Yokosuka und Kollegen beobachteten, dass NP einen Einfluss auf die Entwicklung von Synapsen und Dendriten hatten. Geringere Konzentrationen erhöhten dabei Regionen MAP2- (microtubuli-associated protein 2) und Synapsin I-positiver Zellen, wohingegen hohe Konzentrationen diese in der Immunfluoreszenz reduzierten. NP hatten dabei auch ähnliche Auswirkungen auf Gliazellen wie E2 (Yokosuka *et al.*, 2008). Jie *et al.* konnten zeigen, dass das mRNA-Expressionslevel des sauren Gliafaserproteins (GFAP - glial fibrillary acidic protein) und GFAP-positive Zellen des Hippocampus in der Immunfluoreszenz unter dem Einfluss von NP anstiegen (Jie *et al.*, 2016). Auch andere Arbeitsgruppen wiesen einen Einfluss von NP auf verschiedene neuronale Zelltypen nach. In PC12-Zellen wurde durch NP das Neurotrophin-medierte Auswachsen von Neuriten gehemmt (Bevan *et al.*, 2006) und die neuronale Differenzierung reduziert (Nishimura *et al.*, 2014). Kein Einfluss von NP wurde jedoch auf die Morphologie und das Dendritenwachstum von Purkinje-Zellen festgestellt (Shikimi *et al.*, 2004), jedoch wurde das Auswachsen MAP2-positiver Zellfortsätze hippocampaler Neuronen gehemmt (Matsunaga *et al.*, 2010). In einem Modell mit Hühnerembryos untersuchten Forscher *in ovo* die Neuronen mittels Elektronenmikroskopie. Sie detektierten Schäden an Mitochondrien-, Plasma- und Nucleusmembran der sich entwickelnden Neuronen. Die NP-behandelten Hühnerneuronen hatten unregelmäßige Zelloberflächen mit Pseudopodien, Zellschrumpfung und Durchbrüchen der Plasmamembran (Pretorius *et al.*, 2006). Dies wurde mit apoptotischen Prozessen in Zusammenhang gebracht, was auch andere Studien, in denen die Aktivität der Caspase-3 und der Untergang von Neuronen untersucht wurden, auf die neurotoxischen Effekte des NP zurückführen (Aoki *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Litwa *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2008). In Tierstudien mit Nagetieren konnte bereits eine positive Assoziation zwischen der Zufuhr von NP und der Lern- und Gedächtniskapazität aufgezeichnet werden, auch wenn die Ergebnisse kontrovers sind. Eine orale Gabe von NP durch Anreicherung des Futters mit 50, 100 oder 200 mg/kg/Tag (\approx 4,5; 9; 200 μ M NP) hatte kognitive Beeinträchtigungen männlicher Mäuse zur Folge, Weibchen blieben ohne Veränderungen in den eingesetzten Verhaltenstests (Mao *et al.*, 2011). Die Exposition anderer Nagetiere (Sprague-Dawley Ratten) mit geringen Dosen NP (0,5 und 5 mg/kg KG/Tag \approx 0,7; 7 μ M NP) führte zu einer leichten Verschlechterung im räumlichen Lernen und der Gedächtnisleistung im Labyrinth-Test bei Kawaguchi *et al.* (Kawaguchi *et al.*, 2015a) und

dies sowohl bei männlichen, als auch weiblichen Ratten. Weibchen zeigten zudem Änderungen im emotional- sowie Angst-motivierten Lernen. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte zusätzlich, wie sich NP bei den Nachkommen der exponierten Weibchen auswirkten. Männchen der F1-Generation zeigten nach Exposition der Mütter mit 1 bzw. 10 mg/kg KG/Tag ($\approx 1,4$; 14 μM NP) überraschenderweise eine Verbesserung der Gedächtnisfunktion und räumlichen Orientierung im Labyrinth-Test, alle anderen Testsysteme blieben ohne Unterschied zwischen exponierten und nicht-exponierten Muttertieren (Kawaguchi *et al.*, 2015b). Auch eine weitere Arbeitsgruppe konnte keinen Einfluss auf das Verhalten der F1-Generation im Morris-Water-Maze Test nachweisen (Flynn *et al.*, 2002), dieser Effekt war unabhängig vom Alter der Ratten. Alle anderen Studien an den Nachkommen von Sprague-Dawley Ratten, deren Mütter mit NP gefüttert wurden, konnten jedoch deutliche Störungen der neuronalen Verhaltensentwicklung feststellen. Bei Jie *et al.* zeigten Ratten ein gestörtes Angstverhalten, andere Vermeidungsreflexe und schlechtere Leistung im Morris-Water-Maze Test, sofern ihre Mütter mit NP exponiert und sie somit transplazental mit der Chemikalie in Kontakt kamen (Jie *et al.*, 2013b). Ab einer Konzentration von 50 mg/kg/Tag ($\approx 68 \mu\text{M}$ NP) pränatal und gestational wiesen auch Couderc *et al.* Änderungen in verschiedenen Verhaltenstests bei Ratten nach. Im Open Field Test und Morris-Water-Maze Test waren zunächst nur weibliche Nachkommen betroffen, wobei Männchen nach längerer Zeit ebenfalls Anzeichen von Hyperaktivität zeigten (Couderc *et al.*, 2014). Eine aktuelle Studie aus dem Jahre 2018 assoziierte die Konzentration von NP in verschiedenen Gehirnbereichen erwachsener Ratten mit dem Auftreten von kognitiven Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen und der Gedächtniskonsolidierung. Eine Gabe von 2 mg/kg führte zusätzlich zu erhöhtem Angstverhalten der Tiere (Kazemi *et al.*, 2018).

Eine Studie an Zebrafischen zeigte auf, dass die Exposition mit NP zu einer Störung im zielgerichteten Schwimmverhalten und erhöhtem Aggressionsverhalten männlicher Zebrafische führt (Xia *et al.*, 2010). Auch Fraser *et al.* zeigten verändertes Verhalten bei Zebrafischen nach Exposition der Embryos mit NP, dieses relativierte sich jedoch bereits 96 Stunden nach Fertilisation wieder, was auf eine kompensatorische Fähigkeit der Fische hindeutet (Fraser *et al.*, 2017).

Die Gedächtnisleistung ist mit der Anpassung synaptischer Verbindungen assoziiert. Dabei wird das Kurzzeitgedächtnis durch eine Stärkung oder Schwächung synaptischer Kontakte ausgebildet, während sich beim Langzeitgedächtnis neue Verbindungen knüpfen oder bestehende gehemmt werden (Kandel 2011). Dies wird im Folgenden näher erläutert.

1.7 Synaptische Plastizität und Lernen

Synaptische Plastizität meint eine aktivitätsabhängige Modifikation der Stärke oder Wirksamkeit synaptischer Übertragung bei bereits bestehenden Synapsen. Seit über einem Jahrhundert wird ihr eine zentrale Rolle bei der Fähigkeit des Gehirns zugesprochen, vorübergehende Erlebnisse in die persistente Erinnerungsspur einzubauen. Dabei sind zwei Arten von synaptischer Plastizität bekannt. Die Kurzzeitplastizität moduliert die Stärke von Synapsen in Millisekunden bis Sekunden. Eine Änderung der präsynaptischen Calciumkonzentration vermittelt eine Verstärkung oder Verringerung der synaptischen Übertragungen, je nach Aktivitätslevel des präsynaptischen Neurons (Zucker & Regehr, 2002). Langfristige Änderungen der Synapsenstärke werden durch einen Calciumeinstrom in postsynaptische Neuronen vermittelt. Die Langzeitplastizität führt zu Änderungen der synaptischen Übertragungsstärke von Stunden, Tagen oder länger und formt die Basis für Gedächtnis und Lernen (Hebb, 1949). Man nimmt an, dass synaptische Plastizität eine Schlüsselrolle in der frühen Entwicklung neuronaler Schaltkreise spielt und es gibt Evidenz, dass Beeinträchtigungen synaptischer Plastizitätsmechanismen zu bekannten neuropsychiatrischen Erkrankungen beitragen (Citri & Malenka, 2008). Da die gedächtnisbezogene synaptische Plastizität durch E2 moduliert wird, ist es möglich, dass oral verabreichte östrogenartige EDCs (z. B. geringe Dosen von Umweltchemikalien wie NP) auch die synaptische Plastizität beeinflussen können.

Bislang gibt es nur zwei Studien, welche den direkten Einfluss von NP auf die Langzeitpotenzierung (LTP – long term potentiation) bzw. Langzeitdepression (LTD – long term depression) in verschiedenen Bereichen des Hippocampus untersuchten (Li *et al.*, 2019; Ogiue-Ikeda *et al.*, 2008). Die Perfusion von adulten Ratten mit 100 nM NP führte demnach zu einer 10 %-igen Verringerung der LTD in der CA1-Region (Cornu Ammonis), jedoch zu 10 %-iger Erhöhung der LTD in der CA3-Region und dem Gyrus dentatus (DG). Dieses Ergebnis zeigte genau den gegenteiligen Effekt einer Perfusion mit Östrogen (Ogiue-Ikeda *et al.*, 2008). Li *et al.* behandelten Muttertiere während der Schwangerschaft und Stillzeit mit NP, um die Auswirkungen auf das Lernen und das Gedächtnis ihrer Nachkommen zu untersuchen. Die elektrophysiologischen Aufzeichnungen wurden anschließend im Hippocampus der Neugeborenen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die mütterliche NP-Exposition zu einer schlechten Leistung der Nachkommen im Morris-Water-Maze Test und insbesondere zu einer Beeinträchtigung der LTP führte (Li *et al.*, 2019). Es kann postuliert werden, dass eine Langzeitexposition mit NP in geringen Konzentrationen oder eine

akute hohe Exposition zu Änderungen in der Speicherung von Gedächtnisinhalten führen können. Die Datenlage ist jedoch sehr unzureichend, so dass weitere funktionelle Untersuchungen in diesem Bereich folgen müssen.

1.8 *In vitro* und *in vivo* Modellsysteme

1.8.1 B35-Neuroblastomzellen und Kulturen von Kleinhirnneuronen

Die B35-Neuroblastomzelllinie stellt ein gut etabliertes Modell des zentralen Nervensystems für *in vitro* Versuche dar und wurde aus Nitrosoethylurea-induzierten Tumoren neugeborener Ratten isoliert. Zellen reagieren auf die Entfernung von Serum und die Anwesenheit von cAMP mit schnell auswachsenden Neuriten (Diestel *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 1974), wodurch die Differenzierung eingeleitet wird. B35-Zellen eignen sich besonders gut zur molekularen Analyse von Signalwegen, die Neuritogenese beinhalten (Otey *et al.*, 2003). Des Weiteren stellen B35-Neuroblastomzellen ein gutes Modell für kortikale Zellen dar.

Kleinhirnneuronen werden häufig als Modellsystem für die Untersuchung von neuronaler Entwicklung sowie der Analyse von Mechanismen der Synaptogenese herangezogen. Zusätzlich entwickeln sie, *in vitro* gezüchtet, Eigenschaften von reifen Kleinhirnneuronen, die ansonsten nur *in vivo* beobachtet werden, wie beispielsweise ein ausgedehntes neuritisches Netzwerk (Kraemer & Minichiello, 2010).

1.8.2 Zebrafische (*Danio rerio*)

Fische reagieren besonders sensibel in Bezug auf Umweltgifte. Verschiedene Arten zeigten teratogene, toxische und Verhaltenseffekte bei Kontakt mit NP. Vor allem der japanische Reisfisch (*Medaka*) entwickelt bei Exposition mit 453 nM NP nur noch 20 % männliche Fischnachkommen (Gray & Metcalfe, 1997), was die östrogenen Wirkungen der Chemikalie in eindrucksvoller Weise dokumentiert. Der Zebrafisch hat mittlerweile einen festen Platz in der biologischen Entwicklungsforschung, in letzter Zeit allerdings auch als Modell für Humanerkrankungen, eingenommen (Amatruda & Patton, 2008; Newman *et al.*, 2011). Mit seiner Hilfe lassen sich kognitive Dissonanzen auf einfache Weise darstellen. Abbildung 4 zeigt einen drei Tage alten Zebrafisch und die Regionen, welche für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von Interesse sind.

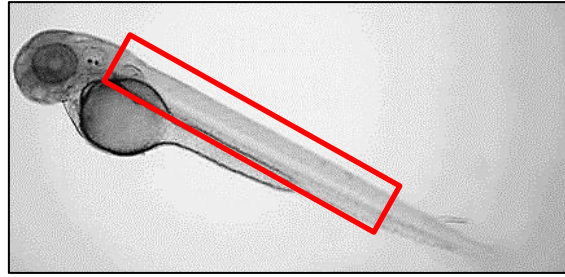


Abbildung 4: Der Zebrafisch (*Danio rerio*) als Modellorganismus (eigene Darstellung)

Die rote Markierung zeigt die Region des Rückenmarks eines drei Tage alten Embryos, die für weitere Untersuchungen von Interesse ist.

Zebrafische durchlaufen in der ersten Phase ihrer Entwicklung spezifische Stadien. Diese werden bezeichnet als Zygote, Spaltung, Blastula, Gastrula, Segmentierung, Pharyngula und Schlüpf-Phase. Nach 24 Stunden beginnt sich hierbei die Körperachse über den Dottersack zu strecken und nach 48 Stunden entwickeln sich die Organe, wobei das Schlüpfen asynchron verläuft. Im frühen Larvenstadium nach 72 Stunden beginnen die Fische mit der Futteraufnahme und zeigen aktives Vermeidungsverhalten (Kimmel *et al.*, 1995). In diesem Stadium haben sie bereits ihre komplette Morphogenese durchlaufen, beginnen zu schwimmen und die Augen zu bewegen. Entwicklungsprozesse können mit diesem Organismus präzise und zuverlässig überwacht werden, indem transgene Fischlinien mit spezifischen fluoreszierenden Proteinen unter Einsatz von Lebendmikroskopie untersucht werden. Die Embryonen entwickeln sich außerhalb des Mutterleibs, sind klein, in hoher Zahl verfügbar und durchsichtig. Aus diesem Grund eignen sie sich besonders für die Untersuchung dynamischer Prozesse wie Zellmigration, für pharmakologische Screenings im Hochdurchsatz und genetische Untersuchungen, einschließlich Untersuchungen von Myelin-assoziierten Genen und veränderter Myelinisierung (Haffter & Nüsslein-Volhard, 1996).

1.9 Die transgenen Fischlinien Tg(Olig2:eGFP) und Tg(CldnK(cyto):eGFP)

Die Myelinisierung von Axonen durch Oligodendrocyten im zentralen Nervensystem (ZNS) und Schwann Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) führt zur schnellen, saltatorischen Erregungsleitung von Aktionspotentialen an den Ranvier'schen Schnürringen (Sherman & Brophy, 2005). Im Zebrafisch wurden bereits einige myelinisierende Proteine charakterisiert. Oligodendrocyten, die myelinisierenden Zellen des ZNS, entspringen einer spezifischen Vorläufer-Region (pMN region – primary motor neuron region) im ventralen Rückenmark (Lu *et al.*, 2000). Dort regulieren Hedgehog Signalwege die Expression notwendiger

Transkriptionsfaktoren, einschließlich Olig2 (oligodendrocyte transcription factor), welche an der Formation von Motorneuronen und reifen Oligodendrocyten beteiligt sind (Lu *et al.*, 2002; Novitsch *et al.*, 2001). Der Gradient von Sonic Hedgehog initiiert dabei das Muster der Auswanderung, welche in der Formation an festgelegten Positionen der dorsoventralen Achse des Rückenmarks kulminiert. Olig2 ist ein Protein, welches von unreifen Oligodendrocyten-Vorläuferzellen (OPCs - oligodendrocyte progenitor cells) exprimiert wird.

Claudine, die zum peripheren Myelin-Protein 22 (PMP22) gehören, besitzen vier Transmembrandomänen und sind Bestandteile von Tight Junctions, da sie mit ZO-1 (Zonula Occludens) co-lokalisieren, welches hierfür spezifisch ist. Tight Junctions in myelinisierenden Glia werden auch autotypische Tight Junctions genannt, da sie benachbarte Myelinmembranen derselben Zellen verbinden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulation von parazellulärer Selektion kleiner Ionen (Findley & Koval, 2009). Claudin K (CldnK), auch bekannt als Claudin 31, wird von reifen Oligodendrocyten und Schwann Zellen exprimiert, wobei die Expression bereits zwei Tage nach Fertilisation (dpf - days post fertilization) im Hinterhirn und rostralen Rückenmark detektiert werden kann. Die Expressionsmuster von CldnK gehen konform mit der Myelin-spezifischen Expression von Claudin 11 im ZNS und Claudin 19 im PNS von Säugetieren (Muenzel *et al.*, 2012).

Bei den eingesetzten transgenen Fischlinien sind die Zielproteine mit dem grün-fluoreszierenden Protein (eGFP – enhanced green fluorescent protein) fusioniert. Mithilfe des Reporters kann die Proliferation, dorsale Wanderung und Reifung von OPCs und Oligodendrocyten überwacht werden.

2 Zielsetzung

Erste Ergebnisse aus Vorarbeiten deuten darauf hin, dass NP in noch geringeren Konzentrationen auf entwicklungsabhängige Prozesse des Nervensystems wirken als bisher beschrieben wurde. NP-Einträge aus der Umwelt können so nach Akkumulation in fettreichem Gewebe zu langfristigen Auswirkungen auf die Gedächtniskonsolidierung führen. Die Manifestation neuropsychologischer Erkrankungen durch ein Zusammenspiel verschiedener endokriner Disruptoren in Kombination mit dem physiologischen Alterungsprozess des Gehirns ist also durchaus möglich. In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst NP-Konzentrationen identifiziert werden, die Effekte auf verschiedene Zellparameter in der Entwicklungsphase des Nervensystems nach sich ziehen. Weiterhin werden die zugrundeliegenden Mechanismen der NP adressiert. Eine Isomer-spezifische Analyse ist wichtig, um schlussendlich ggf. auch Grenzwerte innerhalb der EU anpassen zu können. Im Einzelnen sollen in der vorliegenden Arbeit verschiedene Teilaspekte untersucht werden:

Mithilfe der B35-Neuroblastomzelllinie wird *in vitro* das toxische Potenzial der NP abgeschätzt. Es folgen deskriptive Untersuchungen zum Einfluss von NP auf verschiedene Zellcharakteristika, die mit neuronalen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* assoziiert sind (Proliferation, Migration, Adhäsion, Cytoskelett). Der Grad der Zelldifferenzierung unter Anwesenheit von NP wird anhand der Länge der Neuriten und deren Verzweigungsgrad abgeschätzt. Eine Verifizierung wird anschließend mithilfe von murinen Primärneuronen vorgenommen. Da Synaptogenese im adulten Gehirn wichtig für Lernen und Gedächtnisprozesse ist, werden anschließend die Effekte von NP auf die Bildung synaptischer Kontakte *in vitro* in immunochemischen Analysen untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung der NP-Wirkung auf das Auswachsen von B35-Zellfortsätze *in vitro*, wird auf die isolierten NP-Isomere NP65, NP111 und NP112 zurückgegriffen, die hinsichtlich ihrer spezifischen Östrogenität untersucht werden. Hierbei wird es von besonderer Wichtigkeit sein, ob manche Isomere stärkere oder schwächere Auswirkungen auf die Neuritogenese haben werden.

Da östrogenähnliche Wirkungen der NP durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege hervorgerufen werden können, wird der zugrunde liegende molekulare Mechanismus adressiert. Die Effekte von NP werden mithilfe der Aktivität der

ERK1/2 Kinase, einem Bestandteil des Membran-gekoppelten GPR30, der im nicht-genomischen Östrogensignalweg eine Rolle spielt, abgeschätzt.

Zur Analyse der Auswirkungen von NP auf das Nervensystem *in vivo*, wird der Zebrafisch als Modellorganismus herangezogen. Dazu erfolgt die Sichtbarmachung myelinisierender Zellpopulationen in transgenen Fischlinien durch die Fusion mit dem fluoreszierenden Protein eGFP. Die Anzahl dorsal migrierender Olig2- und CldnK-positiver Zellen gibt Aufschluss über die entwicklungsabhängige Differenzierung des ZNS. Sagittalschnitte der Zebrafische charakterisieren zusätzlich Bereiche erhöhter Proliferation und Apoptose.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Es wurden nur Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* oder höher verwendet.

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (AraC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI)	Molecular Probes, Eugene (USA)
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Acti-stain™ 488 Phalloidin	Cytoskeleton, Denver (USA)
Agarose UltraPure™	Invitrogen Braunschweig
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Autoradiography GBX Entwickler Carestream® Kodak®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Autoradiography GBX Fixierer Carestream® Kodak®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat-Tetrahydrat (Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dibutyryl cyclo-AMP (db cAMP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
Direct Blue 71	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose GlutaMAX (4,5 g/L) Gibco® (DMEM-HG)	ThermoFischer, Braunschweig
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR BDH Prolabo, Darmstadt

Materialien

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethyl-3-Aminobenzoatmethansulfonat (MS-222)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin Biowest, Nuaille (Frankreich)
Formaldehydlösung (37 %)	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	Fluka Chemie, Buchs
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Blotting grade pulver), fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Chemsolute®, Renningen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	JT Baker®, Griesheim
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Acros Organics/ThermoFisher, Braunschweig
Nonylphenol-Gemisch	Fluka Chemie, Buchs
N-Phenylthiourea (PTU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM® Reduced Serum Medium Gibco®	ThermoFischer, Braunschweig
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin 100x (10.000 I.U. Pen; 10.000 µg/mL Strep) Gibco® (P/S)	GE Healthcare, Freiburg Lonza, Köln
PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium	ThermoFischer, Braunschweig
Pferdeserum (HS)	c. c. pro, Oberdorla
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	c. c. pro, Oberdorla
Poly-L-Lysin, 70 - 150 kDa (PLL)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Radioimmunoprecipitation-Assay Lysepuffer (RIPA)	c. c. pro, Oberdorla
Rotiphorese® Gel 40 (40 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung im Verhältnis 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SERVA Blue R	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton® X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin 10x	c. c. pro, Oberdorla
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 %/0,2 % w/v in 10x PBS)	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Merck, Darmstadt

3.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Hersteller/Bezugsquelle
Blotkammer: SD Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot®	Bio-Rad, Hercules (USA)
CO ₂ -Brutschrank: CB-150	Binder, Tuttlingen
Elektrische Pipettierhilfe: Pipetus® Standard	Hirschmann, Eberstadt
ELISA-Reader: Tirtertek® PLUS MS2 Reader	ICN, Meckenheim
EnSight Multimode Plate Reader	PerkinElmer Cellular Technologies Germany GmbH, Hamburg
Gelkammer für SDS-PAGE: Mini Protean® II Cell	Bio-Rad, München
Heizblock: HTB 130	HCL-Haep Labor Consult, Bovenden
Intas ECL und Fluoreszenz Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Laborgasbrenner: Gasprofi 1 ^{SCS}	WLD-Tec, Göttingen
Magnetrührer mit Heizplatte: Variomag® Electronicrührer Monotherm	HP-Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Plattformschüttler (wippend): Duomax 1030 Rocking Platform	Heidolph Instruments, Schwabach Biometra®, Göttingen
Spannungsquellen: 2301 Macrodrive 1 Power Supply Power Pack Biometra P25	LKB, Stockholm, Schweden Analytic Jena A.G., Jena

pH-Messgerät: Mettler Toledo FE20/EL20	Mettler, Gießen
Pipettierhelfer Macro	Brand, Wertheim
Reinstwassersystem: PURELAB flex	Veolia Labwater Technologies, Celle
Sterilbank	BIO-FLOW GmbH, Meckenheim
Vakuumpumpe: MZ2C (1,7 m ³ /h)	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer: 54117 Reaxtop Vortex-Genie® 2 G506E	Heidolph Instruments, Schwabach Heidolph Instruments, Schwabach Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waagen: B6 Feinwaage 440-35N	Mettler, Zürich (Schweiz) Kern, Balingen
Zählkammer, Neubauer improved	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Zentrifuge: Labofuge 200, Rotor: Sepatech 3760 Z 36 HK, Rotoren 221.15/221.23 V01/V02 EBA 200 Eppendorf Centrifuge 5415 0318	Heraeus Instruments, Osterode Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen Hettich GmbH, Tuttlingen Eppendorf Gerätebau, Oldenburg

3.3 Mikroskope

Tabelle 5: Mikroskope

Name	Equipment	Objektiv	Bezugsquelle
2-Photonen TriM Scope II	Plan-Apochromat	20x/1.0 W DIC M27 75mm	LaVision BioTec
Leica DM IL	Inverser Phasenkontrast	5x, 10x	Leica, Wetzlar
Leica DMIRE2	DFC350 FX Kamera, Timelapse	5x	Leica, Wetzlar
Zeiss LSM510	Plan Apochromat, konfokale Laser	63x/1.4	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Zeiss Axiovert 200	Inverser Phasenkontrast, Fluoreszenz	5x, 10x, 20x	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Zeiss Axioplan 2	ApoTome System	20x	Carl Zeiss Microscopy, Jena

3.4 Software

Tabelle 6: Software

Name	Hersteller/Bezugsquelle
AxioVision Release 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy, Jena
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA (USA)
ImageJ	National Institutes of Health (NIH) (open source)
Intas ChemoStar Analysesoftware	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
FilaQuant	Universität Rostock, zur Verfügung gestellt von Prof. Konrad Engel und Dr. Harald Birkholz
Leica FW4000	Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge (UK)
LMS510	Carl Zeiss Microscopy, Jena
SynPAnal Synaptic Puncta Analyzer	Medizinische Hochschule Wisconsin (USA), zur Verfügung gestellt von Dr. Eric Danielson
Zeiss KS100	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen

3.5 Arbeitsmaterialien

Tabelle 7: Arbeitsmaterialien

Arbeitsmaterialien	Hersteller/Bezugsquelle
Chromatographiepapier: 3 mm Chr Whatman™	GE Healthcare, Freiburg
Deckgläser rund, Ø 12 mm	ThermoFisher, Braunschweig
Kryoröhren	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroschraubröhren (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten (0,32 cm ²): Corning™ Costar™ 96-Well, schwarz Greiner Bio-One™ 96-Well, transparent Standard U-Form, transparent für Proteinkonzentrationsbestimmung	ThermoFisher, Braunschweig Greiner Bio-One, Frickenhausen Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Multiwellplatten: TC Platte 12 Well (3,8 cm ²) BD Falcon™ 12-Well (3,8 cm ²) TC Platte 24 Well (1,82 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht BD Labware, Franklin Lakes (USA) Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran: Amersham™ Protan™ (0,2 µm) Hybond™ - ECL (0,2 µm)	GE Healthcare, Freiburg GE Healthcare, Freiburg
Objektträger, 76 x 25 x 1 mm	Knittel, Braunschweig
Pasteurpipetten aus Glas, 230 mm	Brand, Wertheim
Pipetten (diverse Typen)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; ThermoFisher, Schwerte; Labsystems, Engelsbach;

Materialien

	Hach Lange, Düsseldorf
Pipettenspitzen: 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße: 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL; 15 mL; 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme: LucentBlue X-Ray Film	Advansta, Menlo Park CA (USA)
Serologische Pipetten: 1 mL; 2 mL; 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Falcon™ ThermoFischer, Braunschweig
Sterilfilter: Millex™ Syringe Driven Filter Unit	Merck, Bedford (USA)
Zellkulturflaschen: TC Standard T75 (75 cm ²) + T25 (25 cm ²) mit gelbem Belüftungsdeckel (Cell+) T75 (75 cm ²) mit rotem Deckel	Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen: BD Falcon™ Easy Grip 35 mm (9,6 cm ²) BD Falcon™ Easy Grip 60 mm (19.5cm ²) SUREGrip Standard 100 mm (58 cm ²)	BD Labware, Franklin Lakes (USA) BD Labware, Franklin Lakes (USA) Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. S. Diestel, IEL, Universität Bonn
Zellschaber für den Einmalgebrauch	Sarstedt, Newton (USA)

3.6 Kits und Standards

Tabelle 8: Kits und Standards

Name	Bezugsquelle
Chemilumineszenzlösungen: SuperSignal™ West Pico + Dura WesternBright ECL + Quantum	ThermoFisher, Braunschweig Advansta, Menlo Park CA (USA)
Click-iT® Edu Imaging Kit (Alexa Fluor® 488)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
CytoSelect™ Cell Viability and Cytotoxicity Assay Kit (MTT)	Cell Biolabs, San Diego (USA)
DC™ Protein Assay Kit (Bradford)	Bio-Rad, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder PageRuler™ Unstained Protein Ladder	ThermoFisher, Braunschweig ThermoFisher, Braunschweig

3.7 Antikörper

Tabelle 9: Primärantikörper

AK – Antikörper; IF – Immunfluoreszenz; WB - Westernblot

Primär-antikörper	Eigenschaften	Bezugsquelle	Verdünnungs-faktor/ Anwendung
anti- α -Tubulin	Monoklonaler Maus-AK (IgG1) Ziel: Tubulin- α -1/2/3 Konzentration: 394 μ g/mL	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa (USA)	1:1000 in Blockierlösung III (WB)
anti- α -Tubulin	Monoklonaler Ratten-AK (IgG2a) Ziel: Tubulin- α -1A Konzentration: 1000 μ g/mL	Novus Biologicals, Littleton, CO (USA)	1:200 in Blockierlösung I (IF)
anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Polyklonaler Kaninchen-AK (IgG) Ziel: Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 Konzentration: 84 μ g/mL	Cell Signaling Technology, Frankfurt	1:5000 in Blockierlösung III (WB)
anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Polyklonaler Kaninchen-AK (IgG) Ziel: Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3, phosphoryliert an Thr202/Tyr204 (Erk1) oder Thr185/Tyr187 (Erk2) Konzentration: 177 μ g/mL	Cell Signaling Technology, Frankfurt	1:3000 in Blockierlösung III (WB)
anti-Synaptophysin	Monoklonaler Kaninchen-AK (IgG) Ziel: Synaptophysin Konzentration: n. a.	Cell Signaling Technology, Frankfurt, zur Verfügung gestellt von Daniel Mitoi, LIMES, Universität Bonn	1:200 in Blockierlösung II (IF)

Tabelle 10: Sekundärantikörper

AK – Antikörper; IF – Immunfluoreszenz; WB - Westernblot

Sekundär-antikörper	Eigenschaften	Bezugsquelle	Verdünnungs-faktor/ Anwendung
anti-rabbit-Cy TM 3	Cy TM 3-konjugierter Ziegen-AK gegen Kaninchen IgG Konzentration: 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch, Ely (GB)	1:500 in Blockierlösung I (IF)
anti-rabbit-POD	Peroxidase-konjugierter Ziegen-AK gegen Kaninchen IgG Konzentration: 0,8 mg/mL	Jackson ImmunoResearch, Ely (GB)	1:10.000 in Blockierlösung III (WB)
anti-mouse-POD	Peroxidase-konjugierter Ziegen-AK gegen Maus IgG Konzentration: 0,8 mg/mL	Jackson ImmunoResearch, Ely (GB)	1:20.000 in Blockierlösung III (WB)

anti-rat-Cy TM 3	Cy TM 3-konjugierter Ziegen-AK gegen Ratten IgG Konzentration: 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch, Ely (GB)	1:500 in Blockierlösung I (IF)
-----------------------------	--	----------------------------------	--------------------------------

3.8 Biologisches Material

3.8.1 Zelllinien

Tabelle 11: Zelllinie

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
B35	Adhärente Neuroblastom-Zelllinie von <i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)	Zur Verfügung gestellt von Professorin Dr. Maness, University of North Carolina, Chapel Hill (USA)

3.8.2 Primärneuronen

Tabelle 12: Gewebe

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
Cerebellare Neuronen	Gehirngewebe von Wildtyp C57B/6 (postnataler Tag 3-4) Mäusen	Zur Verfügung gestellt vom Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

3.8.3 Transgene Fischlinien

Tabelle 13: Transgene Fischlinien

Name	Beschreibung	Referenz
Tg(claudinK(cyto):eGFP)	GFP-Expression in frühen reifen Oligodendrocyten und Schwanzzellen.	(Muenzel <i>et al.</i> , 2012)
Tg(olig2:eGFP)	GFP-Expression von frühen Oligodendrocyten und einigen Motoneuronen-Vorläuferzellen	(Shin <i>et al.</i> , 2003)

3.9 Lösungen, Medien und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den eingesetzten Lösungen, Medien und Puffer um einfache Konzentrierungen. Der pH-Wert wurde mit HCl und NaOH eingestellt und alle Lösungen mit zweifach destilliertem (bidest.) Wasser angesetzt. Die verwendeten Reagenzien haben Raumtemperatur (RT), Abweichungen werden gesondert angegeben.

3.9.1 Allgemeine Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 10x

1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
81 mM	Na ₂ HPO ₄
15 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,2	

Lösung B 1000x

7 mM	CaCl ₂
5 mM	MgCl ₂

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10x

1,37 M	NaCl
0,2 M	Tris
pH 7,6	

TBST

TBS	
0,05 % (v/v)	Tween® 20

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)

PBS	
0,1 % (v/v)	Lösung B

3.9.2 Zellkulturmedien und andere Lösungen für die Zellkultur

Medium für B35-Zellen

DMEM-HG	
10 % (v/v)	FCS
1 % (v/v)	P/S

Medium für Neuronen

DMEM-HG	
10 % (v/v)	HS

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS⁻) 10x

0,54 M	KCl
0,44 mM	KH ₂ PO ₄
13,7 M	NaCl
0,55 M	D-Glucose
3,0 mM	Phenolrot
pH 7,2 - 7,4	

HBSS⁻/EDTA

HBSS ⁻	
5 mM	EDTA

(db) cAMP-Stammlösung

DMSO	
250 mM	(db) cAMP

Medium für Zelldifferenzierung

Opti-MEM®	
1 mM	(db) cAMP-Lösung

PLL-Lösung für B35-Zellen (0,002 %)

H₂O bidest.
0,02 mg/mL PLL

PLL-Lösung für Neuronen (0,01 %)

H₂O bidest
0,1 mg/mL PLL

Trypsinierungsreagenz

Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 %/0,2 % (w/v)) 10x
1:10 in sterilem H₂O bidest.

AraC-Stammlösung

DPBS
4 mM AraC

DNase I-Lösung (-20 °C) (0,2 %)

PBS
2 mg/mL DNase I

Trypsin-Lösung (-20 °C) (0,1 %)

Trypsin-Lösung 10x (1:250)
1:10 in sterilem H₂O bidest.
1:2,5 in sterilem PBS

Trypsin/DNase I-Lösung (-20 °C) (0,05 %/0,1 %)

DNase I-Stammlösung
1:1 in Trypsin-Stammlösung

DNase I-Lösung in DMEM-H (0,05 %)

Medium für Neuronen
0,05 % (v/v) DNase I-Lösung (0,2 %)

Crystal Violet Färbelösung

H₂O bidest
2 % (v/v) Ethanol
0,1 % (w/v) Crystal Violet

3.9.3 Lösungen für immunfluoreszenzmikroskopische Analysen

Fixierlösung I (4 °C)

DPBS
3,7 % (v/v) Formaldehyd

Fixierlösung II (eiskalt)

Methanol (100 %)

Fixierlösung III (4 °C)

DPBS
3,7 % (w/v) PFA

Blockierlösung I

DPBS
1 % (w/v) BSA

Blockierlösung II

DPBS
0,5 % (v/v) HS

Permeabilisierungslösung I

DPBS
0,1 % (v/v) Triton ® X-100

Permeabilisierungslösung II

DPBS
0,5 % (v/v) Triton ® X-100

Waschlösung I (4 °C)

DPBS

Waschlösung II (4 °C)

DPBS
3 % (v/w) BSA

Kernfärbung

Hoechst 33258
1:1000 in DPBS

Acti™ 488 Phalloidin-Lösung

DPBS
175 nM Acti™ 488 Phalloidin

DiI-Lösung

Medium für Neuronen
10 nM DiI

3.9.4 Lösungen für proteinbiochemische Analysen

3.9.4.1 Lösungen für die Herstellung von Zelllysaten

RIPA-Lysepuffer (4 °C)

RIPA-Puffer
1 mM PMSF

3.9.4.2 Lösungen für die Ermittlung von Proteinkonzentrationen

BSA für Bradford Protein Assay

1 mg/mL

3.9.4.3 Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

4x Probenpuffer

0,25 M Tris HCl, pH 6,8
40 % (v/v) Glycerol
20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
12 % (v/v) SDS
0,25 % (v/v) Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer

247,7 mM Tris
34,7 mM SDS

APS-Lösung

10 % (v/v) APS

Tris HCl Puffer

1 M Tris HCl, pH 6,8 (für Sammelgele)
1,5 M Tris HCl, pH 8,8 (für Trenngele)

SDS-Lösung

10 % (w/v) SDS

3.9.4.4 Lösungen zur Färbung von Proteinen in SDS-Gelen**Coomassie-Färbelösung**

0,1 % (w/v) Coomassie Serva Blue R
10 % (v/v) Essigsäure (96 %)
50 % (v/v) Methanol

Entfärbelösung

10 % (v/v) Essigsäure (96 %)
30 % (v/v) Methanol

3.9.4.5 Lösungen für Westernblot und Immundetektion von Proteinen**Transfer-Puffer**

38 mM Tris
39 mM Glycin
1,3 mM SDS
20 % (v/v) Methanol

Stripping-Puffer

0,5 M NaCl
0,2 M Glycin
pH 2,8

Neutralisationspuffer

20 mM Tris
pH 8,8

Blockierlösung III

TBST
5 % (w/v) Milchpulver fettarm

Chemilumineszenz-Lösung

Luminol-Reagenz und Peroxidase-Reagenz 1:1

3.9.4.6 Lösungen zur Färbung von Proteinen auf Membranen**Direct Blue Stammlösung**

0,1 % (w/v) Direct Blue 71

Direct Blue Färbelösung

8 % (v/v) Direct Blue Stammlösung
40 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure (96 %)

Ponceau S Färbelösung

0,3 % (w/v) Ponceau S
10 % (v/v) Essigsäure (96 %)

3.9.5 Lösungen für die Zebrafisch-Versuche

Danieau-Medium 0,3x

17 mM NaCl
2 mM KCl
1,8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
1,5 mM HEPES
0,12 mM MgSO_4
pH 7,6

MS-222 20x

0,32 % (v/v) MS222
in 30 % Danieau

Danieau + PTU

Danieau-Medium (30%)
1,5 mg/mL PTU

4 Methoden

Die Experimente wurden in den Laboratorien von Frau PD Dr. Simone Diestel durchgeführt (Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Abteilung Human Metabolomics, Universität Bonn). Ab 2016 erfolgte die experimentelle Arbeit im Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn.

Die Zebrafische wurden in einer Fischanlage der Core Facility unter der Leitung von Prof. Dr. Benjamin Odermatt (Anatomisches Institut, Universität Bonn) nach Standardmethoden gehalten und gezüchtet. Bei Verpaarung, Fütterung, Eisammlung und Auswertung waren Felix Häberlein, Enrico Mingardo und Tobias Lindenberg behilflich.

Die Haltung und Verpaarung der Mäuse wurde von Mitarbeitern des Mausstalls des Anatomischen Instituts übernommen.

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivieren von Zellen

Die Zellkulturen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei einer Temperatur vor 37 °C inkubiert. Die Aufzucht der B35-Zellen erfolgte dabei in T75-Kulturflaschen mit Standardmedium, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreichten, wurden sie in neue Subkulturen aufgeteilt. Dafür wurde das alte Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 5 mL HBSS⁻ gewaschen, um Reste des Serums zu entfernen. 1 mL Trypsin/EDTA initiierte die Abheftung der Zellen vom Flaschenboden durch leichtes Klopfen gegen die Flasche. Abgelöste Zellen wurden in 5 mL Kulturmedium aufgenommen, in eine 15 mL Röhre überführt und für sieben Minuten bei 310 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 6 mL frischem Kulturmedium und Verdünnung der Zellen in neue Kulturflaschen mit frischem Medium. Die verwendeten Cell+ Flaschen wiesen eine besondere Beschichtung mit positiv geladenen Stickstoffverbindungen auf, welche die Anhaftung der adhärenen Zellen unterstützte.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

B35-Zellen wurden wie oben beschrieben aus den Kulturflaschen gelöst. Nach Zentrifugation erfolgte die Resuspension der Zellen in 900 µL Kulturmedium. Die Zugabe von 100 µL DMSO unter sanftem Schwenken der Röhre diente dem Gefrierschutz der Zellen. Diese lagerten anschließend in Kryoröhren bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff.

B35-Zellen wurden aufgetaut, indem sie durch Handwärme und direkte Zugabe von Kulturmedium zügig suspendiert und in eine 15 mL Röhre mit 9 mL vorgelegtem Medium überführt wurden. Nach Zentrifugation für sieben Minuten bei 310 x g, Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in 1 mL neuen Kulturmedium wurde die Zellsuspension zur Anzucht in eine T75-Kulturflasche mit 9 mL vorgelegtem Medium überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel.

4.1.3 Analyse der NP-Toxizität mittels MTT

Die Viabilität einer Zelle wird durch ihre metabolische Aktivität charakterisiert und kann durch Inkubation der Zellen mit einem Tetrazolium-Salz bestimmt werden. Metabolisch aktive Zellen spalten das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT)-Reagenz in ein farbiges Formazan-Produkt, welches colorimetrisch detektiert werden kann. Hierfür wurden $1,0 \times 10^5$ B35-Zellen in 0,002 % PLL-beschichtete 24-Well Platten ausgesät und für drei Tage mit 0,05 nM, 1 nM, 100 nM oder 1 µM NP behandelt. DMSO diente als Negativ- und Methanol als Positivkontrolle zur Validierung der Funktionalität des Assays. Die Gesamtkonzentration an DMSO belief sich sowohl in den Kontrollen, als auch in den NP-Behandlungen auf 0,1 %. Bei dieser Konzentration kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu Auswirkungen auf Zellparameter kommt, die dem organischen Lösungsmittel zuzuschreiben sind. Methanol führt zum kompletten Absterben der Zellen.

Im Weiteren werden Zellen, welche mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden, häufig synonym als „unbehandelt“ bezeichnet. Für die Detektion wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen, um tote und lose adhärenierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurden 200 µL/Well des MTT-Reagenzes hinzugegeben und für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ zusammen mit den Zellen inkubiert, bis sich ein lilafarbenes Präzipitat absetzte. Anschließend inkubierten 200 µL Detergenz-Lösung pro Well für weitere zwei Stunden bei RT im Dunkeln. Die colorimetrische Detektion wurde in einer 96-Well Platte im ELISA-Reader bei 550 nm durchgeführt. Die Absorption ist dabei proportional zur Konzentration metabolisch aktiver Zellen.

4.1.4 Analyse der Zellproliferation mittels EdU

Die Proliferationsrate der B35-Zellen unter Einfluss von NP wurde anhand des Click-iT® EdU Imaging Kits von Invitrogen ermittelt. Das Thymidin-Analogon EdU (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin) interkaliert während der aktiven DNA-Synthese in die DNA, die Detektion basiert auf einer Kupfer-katalysierten kovalenten Reaktion zwischen einem Azid und einem Alkin. EdU enthält dabei das Alkin, der Alexa Fluor® Farbstoff das Azid. Alexa Fluor® 488 emittiert grüne Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von ca. 519 nm. Die Aussaat der B35-Zellen erfolgte auf 0,002 % PLL beschichteten Deckgläschen in 12-Well Schalen. Am folgenden Tag wurden die Zellen dann mit NP (1 nM; 1 µM), (db) cAMP in Opti-MEM® (Positivkontrolle) oder DMSO in Kulturmedium (Negativkontrolle) behandelt. Nach drei Tagen wurde die Proliferationsrate der Zellen nach Empfehlung des Herstellers mithilfe des Kits ermittelt. Dafür mussten die Zellen mit einer 10 µM EdU-Lösung inkubiert, nach einer Stunde und 15 Minuten mit Fixierlösung I fixiert und mit Permeabilisierungslösung II durchlässig gemacht werden. Zwischendurch erfolgten jeweils zwei Waschschritte mit Waschpuffer II. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurden anschließend 200 µL des Reaktionscocktails mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper Alexa Fluor® 488 verwendet und für 30 Minuten inkubiert. Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 konnten die Deckgläschen in PermaFluor™ eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 mit ApoTome System bei 20-facher Vergrößerung ausgewertet werden. Es erfolgte eine visuelle Auszählung aller Zellen, welche EdU inkorporiert haben. Diese wurde prozentual zur Gesamtzahl aller Zellen gesetzt.

4.1.5 Analyse der Neuritenlängen und Neuritenanzahl

Für die Analyse der Neuritenlängen und -anzahl wurden B35-Zellen in 0,002 % PLL beschichtete 35 mm Schalen ausgesät. Es war darauf zu achten, dass Zellen als Einzelzellen und nicht im Zellverbund ausplattiert wurden. Dieser Aspekt ist von Bedeutung, da in diesem Fall das zellautonome Neuritenwachstum bestimmt wurde, welches unabhängig von homophilen Transinteraktionen durch Zelladhäsionsmoleküle oder wachstumsfördernde Substanzen, wie z. B. Laminin, ist. Ein Teil der Zellen wurde einen Tag vor der NP-Behandlung durch Zugabe von (db) cAMP differenziert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 2 mL HBSS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von serumfreiem Opti-MEM® Medium, dem (db) cAMP in angegebener Konzentration zugefügt war. Es ist bekannt, dass (db) cAMP zu einer Differenzierung der Zellen und damit

zu einem reiferen Phänotyp mit verstärktem Neuritenwachstum führt. Die übrigen Zellen wurden in reinem Opti-MEM® Medium ohne Zugabe von (db) cAMP kultiviert. Einen Tag darauf wurde DMSO als Kontrolle oder verschiedene Konzentrationen von NP oder NP-Isomeren (NP65, NP111, NP112) zugegeben (Tabelle 14). Für die Langzeitversuche wurden die Zellen, nachdem sie nach ca. drei bis vier Tagen Konfluenz erreicht hatten, gesplittet und wie oben beschrieben kultiviert, bis sie in 35 mm Schalen ausgesät wurden. Nach einer drei- bis 11-tägigen Behandlung wurden die B35-Zellen mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop bei 20-facher Vergrößerung fotografiert und später alle Neuritenpositiven Zellen ausgewertet. Die Auswahl der Zellen erfolgte visuell anhand folgender Kriterien: Die Zellen wiesen mindestens einen Neuriten mit einer Länge von über 5 µm auf. Die Zellen waren nicht im Zellverbund und ihre Neuriten hatten keinen Kontakt zu anderen Zellen. Für die Auswertung der Neuritenanzahl wurde manuell ausgezählt, wie viele Zellfortsätze einzelne Zellen nach dreitägiger Inkubation mit dem NP-Gemisch aufwiesen. Für die Bestimmung der Neuritenlängen wurden pro Bedingung die Längen von 100-200 Neuriten mittels Zeiss KS100 Software analysiert, wobei die Strecke vom Übergang des Zellsomas zum Neuriten bis zum Ende des Neuriten gemessen wurde. Pro Experiment zeigte die Gesamtlänge aller Neuriten geteilt durch die Anzahl an Zählungen den Mittelwert (MW) der Neuritenlänge an. Zusätzlich wurde exemplarisch die Verteilung der Neuritenlängen bestimmt.

Tabelle 14: Dauer und Art der Behandlung bei der Analyse der Neuritenlängen

Name	Dauer der Behandlung	Eingesetzte Konzentrationen
NP-Gemisch	3 Tage	0,05 nM
	11 Tage	0,05 nM
NP65	3 Tage	0,05 nM; 1 nM; 100 nM, 1 µM
	11 Tage	0,05 nM; 100 nM
NP111	3 Tage	0,05 nM; 1 nM; 100 nM, 1 µM
	11 Tage	0,05 nM; 100 nM
NP112	3 Tage	0,05 nM; 1 nM; 100 nM, 1 µM
	11 Tage	0,05 nM; 100 nM

4.1.6 Analyse der Zelladhäsion mittels Crystal Violet

B35-Zellen wurden in 0,002 % PLL-beschichtete 60 mm Schalen für drei Tage in Anwesenheit von NP (1 nM; 1 µM) oder DMSO als Kontrolle kultiviert. Nach vorsichtigem mechanischem Abschaben der Zellen mit HBSS/EDTA und Zentrifugation, wurden $1,2 \times 10^5$ Zellen auf eine 0,002 % PLL-beschichtete 24-Well Platte ausgesät. Zellen hatten jeweils 30

bzw. 60 Minuten Zeit sich abzusetzen, bevor nicht adhärerte Zellen abgesaugt wurden. Es erfolgten zwei Waschschrte mit DPBS, Fixierung bei RT für 15 Minuten mit Fixierlösung I, zwei weitere Waschschrte und anschließende Färbung mit 0,1 % Crystal Violet für 10 Minuten. Nach zwei weiteren Waschschrten mit H₂O lysierte die 1%ige SDS-Lösung die Zellen. Die Suspensionen wurden in eine 96-Well Platte transferiert und die Absorption im ELISA-Reader colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Absorption ist proportional zur Anzahl adhärierter Zellen nach 30 bzw. 60 Minuten.

4.1.7 Analyse von α -Tubulin und F-Aktin

Um die Anzahl und Länge der Fasern des Cytoskeletts zu ermitteln, und somit Änderungen in Morphologie und Migrationsverhalten zu ermitteln, wurden B35-Zellen für drei Tage in Anwesenheit von DMSO als Kontrolle oder 1 nM bzw. 1 μ M NP auf 0,002 % PLL-beschichteten Glasdeckgläschen kultiviert. Es erfolgte die Fixierung in 3,7 % Methanol-freiem Paraformaldehyd für 10 Minuten. Da Aktinfasern sehr dynamisch und sensibel auf Stress reagieren, wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Es folgte eine Permeabilisierung mit 0,1 % Triton™ X-100 für drei bis fünf Minuten und Blockierung mit 5 % BSA in PBS für 25 Minuten. Der primäre Ratten-anti- α -Tubulin AK wurde 1:200 in Blockierlösung verdünnt und für 30 Minuten bei RT auf die Zellen gegeben. Nach einem Waschschrte mit PBS erfolgte ein weiterer Inkubationsschrte im Dunkeln bei RT für 25 Minuten mit dem Cy™3-konjugierten anti-Ratten Zweitantikörper (1:500 in Blockierlösung) und 75 nM Acti-stain™ 488 Fluorescent Phalloidin. Die Deckgläschen wurden anschließend in PermaFluor™ eingebettet und im Kühlschrank gelagert. Nach Aufnahme der Fluoreszenzbilder mit dem konfokalen Zeiss LSM510 MetaUV Mikroskop wurden Länge und Anzahl von Aktin und Tubulin-Filamenten mit der Software FilaQuant quantifiziert. Die Präferenzen zur Analyse des Aktins wurden wie folgt gewählt: Top-Hat Radius: 6; Noise Penalizer: 0.2; Optimizer Iterations: 167; Max. Vertex Laplacian: -8; Min. Ridgeness: 18; Min. Edge-Length: 2.5; Max. Edge-Length: 170.7; Filament Model Width: 1.2; Checkerboard Penalizer: 0.1; Intensity Threshold: 40; Random Filament Number: 10.

α -Tubulin wurde mit folgenden Einstellungen analysiert: Top-Hat Radius: 11; Noise Penalizer: 0.2; Optimizer Iterations: 1000; Max. Vertex Laplacian: 30; Min. Ridgeness: 45; Min. Edge-Length: 10; Max. Edge-Length: 40.2; Filament Model Width: 1.5; Checkerboard Penalizer: 0.1; Intensity Threshold: 40; Random Filament Number: 10.

4.1.8 Methoden zur Ermittlung des Migrationsverhaltens

4.1.8.1 Wundheilungsassay

Zur Ermittlung der Migrationsfähigkeit der B35-Zellen wurde der zweidimensionale Wundheilungsassay, auch bekannt als Scratch-Test, eingesetzt. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass einem einschichtigen Zellrasen eine reproduzierbare Wunde zugefügt wird, die sich in Abhängigkeit der Migrationsfähigkeit der Zellen unterschiedlich schnell schließt. Dazu wurden die Zellen zunächst auf 0,002 % PLL-beschichtete 12-Well Platten ausgesät und kultiviert, bis sie Konfluenz erreichten. Dies geschah in Anwesenheit von NP (1 nM; 1 μ M) oder DMSO als Kontrolle. 24 Stunden vor Beginn des Experiments wurde das Kulturmedium gewechselt und ein Serum-reduziertes Medium hinzugegeben (0,25 % FCS), um proliferative Effekte der Zellen auszuschließen. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellmonolayer mit einer 100er Pipettenspitze manuell verletzt, indem ein diagonaler Kratzer durch den Zellrasen gezogen wurde. Zur Entfernung von Zelltrümmern und abgelösten Zellen erfolgte ein Waschschriff mit Medium, daraufhin wurden alle Wells mit frischem Serum-reduzierten Medium aufgefüllt und NP ebenfalls erneuert. Die Timelapse Mikroskopie am Leica DMIRE2 ermöglichte es, die Zellen für 24 Stunden im Abstand von jeweils einer Stunde zu überwachen. Hierfür wurden die Parameter der Kammer auf 37 °C und 5 % CO₂ eingestellt und derselbe Bildausschnitt im Abstand von einer Stunde im Phasenkontrast bei 5-facher Vergrößerung fotografiert. Die Breite der Wunde wurde in Image J bestimmt, indem an jeweils drei Stellen pro Wunde der Abstand zwischen den Zellrasen in Pixeln ermittelt wurde.

4.1.8.2 Sphäroid Formationsassay

24-Well Platten wurden vor dem Aussäen der B35-Zellen mit 1 % steriler Agarose beschichtet. Dazu wurde diese erhitzt und im flüssigen Zustand in einer Menge von 350 μ L/Well mit abgeschnittener blauer Pipettenspitze in die Wells gegossen. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurden jeweils 1 mL Medium und 10 μ L Zellsuspension in jede Vertiefung pipettiert und NP in den Konzentrationen 1 nM oder 1 μ M bzw. DMSO als Kontrolle zugegeben. Bereits nach einem Tag bildeten sich so genannte Sphäroide, bei denen die Zellen aneinander im Zellverbund hafteten, sich aber aufgrund der Agarose nicht auf dem Boden der Plastikplatten absetzen konnten. Über einen Zeitraum von drei Tagen wurden die Sphäroide mit NP inkubiert und jeden Tag fotografiert, um ihr Größenwachstum zu überwachen. Die Auswertung der Gesamtfläche der Sphäroide erfolgte in Image J.

4.1.8.3 Migration von Sphäroid-Zellen

Nachdem die Sphäroide der B35-Zellen wie in Versuch 4.1.8.2 gezüchtet wurden, erfolgte deren weitere Kultivierung auf 0,002 % PLL-beschichteten 12-Well Platten, um das Auswachsen zu beobachten. Hierfür wurden Sphäroide gewählt, die in etwa die gleiche Größe hatten. Die Sphäroide konnten mithilfe einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in neues Kulturmedium inklusive DMSO als Kontrolle bzw. 1 nM oder 1 μ M NP umgesetzt werden. Die Timelapse Mikroskopie mit 5-facher Vergrößerung am Leica DMIRE2 ermöglichte es, die Sphäroide über neun Stunden zu überwachen. Nach dieser Zeitspanne hatten die migrierten Zellen den Rand der Bildausschnitte erreicht. Die Parameter der Kammer beliefen sich auf 37 °C und 5 % CO₂. Die Quantifizierung der Phasenkontrast-Aufnahmen mit Image J wurde durchgeführt, indem die Fläche der migrierten Zellen, abzüglich der Größe des jeweiligen Sphäroids in Pixel, berechnet wurde.

4.1.9 Präparation und Kultivierung von Primärzellen

Für die Isolation von Primärzellen des Kleinhirns wurden drei bis vier Tage alte (P3/4 - postnatal) Wildtyp-Mäuse des Stamms C57B/6 verwendet und die Präparation nach Standardmethoden, mit leichten Abwandlungen, durchgeführt (van Echten-Deckert *et al.*, 1997). Nach Dekapitation wurden die Köpfe in einer Petrischale mit PBS platziert, die Schädeldecke abgehoben und das Kleinhirn präpariert. Nach Entfernung von Hirnhäuten und assoziierten größeren Blutgefäßen wurde das Kleinhirn in kleinere Stücke geteilt und in eine 15 mL Röhre mit frischem, eiskaltem HBSS⁻ überführt. Die Gewebestücke wurden dreimal mit eiskaltem HBSS⁻ gewaschen und anschließend für 12-15 Minuten mit 1,5 mL Trypsin/DNAse I Lösung bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 1,5 mL DNAse I enthaltendem Kulturmedium für zwei Minuten bei RT, dem die Resuspension der Gewebestücke folgte. Mithilfe einer Pipettenspitze oder abgerundeten Pasteurpipetten (abnehmender Durchmesser durch Abflämmen der Spitze) wurden die Gewebestücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Kam es nach einer kurzen Inkubation zu einer Sedimentation von undissoziierten Gewebestücken, wurde nur der Überstand für die weitere Zentrifugation für sieben Minuten bei 310 x g in eine neue 15 mL Röhre überführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Kleinhirnneuronen wurden in PLL-beschichtete 35 mm Schalen ausgesät und bei 37 °C mit 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurde 0,04 mM AraC hinzugegeben, um Astrocyten und Gliazellen in ihrer Proliferation zu stoppen.

4.1.10 Analyse der Neuritenlängen von Kleinhirnneuronen

Nach Präparation der Kleinhirnneuronen konnte die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt werden. Jeweils $2,0 \times 10^6$ Zellen wurden in drei 0,01 % PLL-beschichtete 35 mm Schalen ausgesät. Um die Neuronen auch nach Auswachsen der Neuriten noch diskriminieren zu können, wurden zusätzlich $0,5 \times 10^5$ Zellen mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiI gefärbt und ausplattiert. DiI breitet sich durch laterale Diffusion in der gesamten Zelle aus und kann mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei einem Emissionsmaximum von 565 nm detektiert werden. Zur Färbung der Kleinhirnneuronen wurde der Lebendfarbstoff in einer Konzentration von 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ zur Zellsuspension hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für sieben Minuten bei 310 x g wurden die gefärbten Zellen in frischem Kulturmedium homogenisiert und über die bereits ausgesäten ungefärbten Neuronen gegeben. Der Anteil von gefärbten zu ungefärbten Zellen betrug somit 1:200. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit DMSO als Kontrolle oder 1 nM bzw. 10 nM NP. Die Neuronen verblieben für jeweils drei oder 11 Tage in Kultur (DIV - days *in vitro*), bevor die Neuritenlängen bestimmt wurden. Die Erneuerung von Medium und NP-Behandlung erfolgte alle drei bis vier Tage. Mit dem Zeiss AxioVert 200 unter 20-facher Vergrößerung aufgenommene Neuriten in Fluoreszenzbildern wurden mit der KS100 Software in ihrer Länge quantifiziert.

4.1.11 Analyse der Synaptophysin-haltigen Vesikel von Kleinhirnneuronen

Nach Präparation der Kleinhirnneuronen wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen auf 0,01 % PLL-beschichtete Deckgläser in 12-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit DMSO als Kontrolle bzw. 10 nM oder 1 μM NP behandelt. Nach 11 DIV wurden die Neuronen mit Fixierlösung II für 15 Minuten bei RT fixiert, anschließend zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellmembran anschließend mit Permeabilisierungslösung II für 20 Minuten bei RT durchlässig gemacht. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS erfolgte die Zugabe des Synaptophysin-Erstantikörpers für 30 Minuten bei RT. Die Neuronen wurden erneut zweimal gewaschen und für 30 Minuten lichtgeschützt mit dem korrespondierenden anti-rabbit-CyTM3 Zweitantikörper behandelt. Die Einbettung in PermaFluorTM erfolgte nach Waschen der Deckgläser in PBS und destilliertem Wasser. Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss LMS510 Meta UV konfokalen Mikroskop generiert und der Software SynPAnal Synaptic Puncta Analyzer ausgewertet. Der Threshold des Programms (Detektionsschwelle) wurde dabei auf 95 festgelegt, der Kalibrierungsfaktor (= Skalierung) lag bei 0,14277. Er wurde anhand der

Bildinformationen festgelegt (512 x 512 Pixel, 73,1 μm x 73,1 μm , also 0,14277 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$). Mithilfe des Programms konnten die synaptische Dichte pro Länge und die Punkteintensität pro Neurit ausgewertet werden.

4.2 Protein-biochemische Methoden

4.2.1 Zellyse

Im Rahmen der Zellyse wurden die Zellen durch chemische und mechanische Verfahren aktiv zerstört, um an die Proteine für die anschließenden Versuche zur Proteinauftrennung zu gelangen. B35-Zellen wurden in 0,002 % PLL-beschichteten 60 mm Schalen kultiviert und für die Bestimmung der ERK1/2-Phosphorylierung für 10, 20 oder 30 Minuten mit 100 nM NP, 1 μM NP oder DMSO als Kontrolle behandelt. Zur Analyse der konstitutiven ERK-Expression erfolgte die Exposition der Zellen für 72 Stunden mit NP oder der entsprechenden Kontrolle. Für die RIPA-Lyse wurden die B35-Zellen auf Eis platziert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der eiskalte RIPA-Puffer wurde mit 10 μL PMSF-Proteaseinhibitor (100 mM) pro 1 mL Puffer versetzt und 300 μL der Gebrauchslösung in jede Schale gegeben. Das Abschaben der Zellen erfolgte mithilfe von Rubber-Policemen vom Boden der Schalen, wonach diese in 1,5 mL Reagiergefäße überführt wurden. Die Proben inkubierten anschließend unter gelegentlichem kräftigen Mischen im Vortexer für 20 Minuten auf Eis, um die fortschreitende chemische Lyse durch die mechanische Zerstörung der Zellintegrität zu unterstützen. Die Lysate wurden anschließend bei 12.280 x g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, wodurch sich Zelltrümmer als Pellet auf dem Boden der Reagiergefäße absetzten und die Proteine in den Überstand übergangen, welcher in ein neues Reagiergefäß überführt wurde. Zuletzt wurden die Proben bei -20 °C bis zur Proteinkonzentrationsbestimmung und SDS-PAGE aufbewahrt.

4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung von Zellysaten

Für die Bestimmung der Gesamtkonzentration aller Proteine im hergestellten Zellysat wurde der DCTTM Protein Assay gemäß der Herstelleranweisung durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Proteingehalt durch eine Farbreaktion in einem Spektralphotometer colorimetrisch ermittelt, wobei der Farbumschlag proportional zur Konzentration an Protein ist. Mithilfe eines Standards bekannter Konzentration aus BSA in RIPA-Puffer (10 mL/mL Stammlösung) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, welche für die Erstellung der Kalibriergeraden genutzt wurde. Dazu erfolgte die Verdünnung der Stammlösung in 10 Verdünnungsstufen um

jeweils 1:2, so dass eine Reihe von 10 mg/mL bis 0,0195 mg/mL erreicht werden konnte. Die Proben wurden soweit verdünnt, dass ihre Extinktionen im linearen Bereich der Kalibriergeraden lagen. Die entsprechenden Volumina der Standardreihe, Proben und Bestandteile des DC™ Protein Assays, welche im Dreifachansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert wurden, richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Nach einer Inkubation von 15 Minuten erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 690 nm im Photometer. Die Konzentration der Proben wurde anschließend mit GraphPad Prism 5 ermittelt.

4.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt werden, indem sie in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix mit definierter Porengröße in Richtung Anode wandern. Die Anpassung der Porengröße des Trenngels erfolgte durch die Variation des prozentualen Anteils an Acrylamid/Bisacrylamid, für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Analyten wurden 10 %ige, diskontinuierliche Gele eingesetzt. Für 2 x 1,5 mm dicke Gele wurden die Komponenten des Trenn- und Sammelgels wie in Tabelle 15 gemischt. TEMED wurde kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

Tabelle 15: Zusammensetzung von 10%igem Trenn- und Sammelgel der SDS-PAGE

Substanz	Trenngel [mL]	Sammelgel [mL]
H ₂ O	7,9	4,1
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5,0	----
1 M Tris-HCl pH 6,8	----	0,75
30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	6,7	1,0
10 % SDS-Lösung	0,2	0,06
10 % APS-Lösung	0,2	0,06
TEMED	0,008	0,006

Die Lösungen des Trenngels wurden zusammen pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und zwischen die Glasplatten der Gelapparatur gegossen. Für den Zeitraum der Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um Austrocknung zu verhindern. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel vorbereitet und über das Trenngel gegossen. Das Einsetzen der Gelkämme führte zur Bildung von 10 Geltaschen, in welche die Analyten aufgetragen wurden. Nach Polymerisation des gesamten Gels wurden die Glasplatten in die dafür vorgesehene Gellaufapparatur eingesetzt und die Gelkämme entfernt. Der Bereich zwischen den Glasplatten wurde dabei vollständig,

die Laufkammer zu 1/4 mit SDS-Laufpuffer befüllt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese im Verhältnis 1:3 mit 4x Probenpuffer versetzt und in jede Tasche eine Proteinmenge von 30 µg aufgetragen. Nach Aufkochen für fünf Minuten bei 95 °C, Mischen und kurzer Zentrifugation zum Abkühlen, konnten die Proben mit einer Kapillare in die vorbereiteten Geltaschen aufgetragen werden. Um das Molekulargewicht der Proben ermitteln zu können, wurde ein Molekulargewichtsstandard mit definierten Proteingrößen mitgeführt. Laufbedingungen des Sammelgels beliefen sich auf 35 mA für ca. 30 Minuten, während die eigentliche Auftrennung bei einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt wurde. Hatte die Laufmittelfront das Ende des Trenngels erreicht, war der Gellauf beendet und die Glasplatten wurden aus der Gellaufapparatur entfernt, das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Die Gele wurden entweder gefärbt (siehe 4.2.4) oder zum Westernblot (siehe 4.2.5) überführt.

4.2.4 Färbung von Proteinen in Gelen

Mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie®-Brillant-Blau R-250 (chemisch identisch mit dem verwendeten SERVA Blue R) lassen sich Proteinbanden im SDS-Gel unspezifisch anfärben. Die Bindung des Farbstoffs durch Van der Waals Kräfte im sauren Milieu an die Aminogruppen mit einem Detektionslimit von ca. 100 ng Protein ist dabei reversibel. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele für ein bis zwei Stunden in Coomassie Färbelösung unter dauerhaftem Schwenken inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber dauerte je nach Intensität der Blaufärbung ca. 16 Stunden.

4.2.5 Westernblot

Ziel des Westernblots ist die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die Proteine sind anschließend für eine spezifische Immundetektion auf der Membran zugänglich. Die Gele wurden zunächst für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, die Membranen wurden kurz in Aqua. bidest. angefeuchtet und dann zusammen mit Filterpapieren ebenfalls in Transferpuffer inkubiert (*Semi-Dry* Verfahren). Der Aufbau des Sandwichs auf dem unteren Teil der Blotkammer (Anode) wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt: drei Filterpapiere – Nitrocellulosemembran – Gel – drei Filterpapiere. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch Anlegen des Stroms für 1,5 Stunden bei einer elektrischen Stromdichte von 1 mA/cm² Membran. Der erfolgreiche Transfer konnte überprüft werden, indem die Proteine mit dem reversiblen Azofarbstoff Ponceau S angefärbt wurden (siehe 4.2.8).

4.2.6 Immundetektion von Proteinen auf Membranen

Nach Übertrag der Proteine auf Nitrocellulosemembranen sind diese für die Behandlung mit spezifischen Antikörpern zugänglich. Zur Blockierung freier, unspezifischer Proteinbindungsstellen musste die Membran zunächst eine Stunde mit Blockierlösung III abgesättigt werden. Danach wurde die Lösung verworfen und die Membran 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen. Primärantikörper wurden in Blockierlösung III verdünnt, auf die Membran gegeben und wippend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membranen wurden wiederum für 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen, bevor sie der Zweitantikörperbehandlung zugeteilt wurden. Der in Blockierlösung III verdünnte Sekundärantikörper wurde bei RT für ein bis zwei Stunden auf die Membran gegeben und diese anschließend noch einmal für 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen. Schlussendlich folgten zwei Waschschrte mit TBS, um das Tween® 20 für die Chemilumineszenzlösung zu entfernen. Da der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase (POD) gekoppelt ist, kann das Antigen durch Zugabe und Oxidation eines entsprechenden Substrats mittels Chemilumineszenz detektiert werden. Die zwei Komponenten wurden nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 gemischt und je nach Größe der Membran ca. 400-600 µL auf die Membran gegeben. Die Wahl der Chemilumineszenzlösung (Pico/ECL bzw. Dura/Quantum) richtete sich nach der erwarteten Proteinmenge. Für die Detektion des Signals wurde zu Beginn in einer Autoradiographiekassette entwickelt. Hierfür wurde der Röntgenfilm in einer Dunkelkammer auf der Membran platziert und bis zur Sättigung der Bandenintensität exponiert (Expositionszeit abhängig von Signalintensität). Bei der anschließenden Entwicklung wurde der Film für eine Minute in Entwicklerlösung geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und für zwei Minuten in Fixierlösung gelegt. Nach Waschen des Films mit Leitungswasser und anschließender Trocknung konnten die Banden des Markers eingezeichnet werden. Anderen Membranen wurden im automatischen Imager System (Intas ECL und Fluoreszenz Imager) analysiert, bei dem das Programm ChemoStar selbst die optimale Expositionszeit ermittelt. Die Bandenintensität wurden mithilfe der Image J Software ausgewertet. Die konstitutive ERK-Expression (Gesamt-ERK1/2) wurde bestimmt, indem die Banden gegen anti α -Tubulin quantifiziert wurden, bei der Bestimmung von p-ERK1/2 wurden die Banden gegen Gesamt-ERK1/2 normalisiert.

4.2.7 Entfernung von Antikörpern auf Membranen

Nitrocellulosemembranen, die zum Antigen-Nachweis mit Antikörpern behandelt wurden, können für eine erneute Antikörperbehandlung wiederverwendet werden. Dafür wurde die Membran für zwei bis fünf Minuten in Stripping-Puffer inkubiert, wodurch die gebundenen Antikörper entfernt wurden. Anschließend erfolgte die kurze Neutralisation mit dem entsprechenden Neutralisationspuffer.

4.2.8 Färbung von Proteinen auf Membranen

Zur Kontrolle, wie effizient der Übertrag der Proteine auf die Membran funktioniert hat, kommt die reversible **Ponceau S Färbung** nach dem Westernblot-Transfer in Frage. Die Membran wurde hierfür zunächst kurz in Aqua bidest. gewaschen, um die Reste des Transferpuffers zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für eine Minute mit der Ponceau S Färbelösung inkubiert und der Hintergrund durch mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. entfärbt, bis die Proteine sichtbar waren. Die vollständige Entfärbung konnte mithilfe von 60 °C warmem PBS innerhalb von fünf Minuten durchgeführt werden. Für die **Direct Blue Färbung** wurden Membranen für fünf Minuten in Direct Blue Färbelösung inkubiert und der Hintergrund durch mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. entfärbt. Diese Färbung ist sensitiver, jedoch irreversibel.

4.3 Fischversuche

4.3.1 Fischhaltung und Aufzucht

Die Aufzucht und Haltung der transgenen Zebrafischlinien Olig2:eGFP und CldnK(cyto):eGFP erfolgte nach Standardmethoden (Westerfield, 2007). Nach der Verpaarung wurden die Fischeier ca. eine Stunde nach Entfernen der mobilen Trennwand eingesammelt und auf den Zeitpunkt der Befruchtung (null Stunden) datiert. Die weitere Haltung der Fische und Fischembryos außerhalb der Fischanlage geschah in Petrischalen in 28 °C warmen Inkubatoren mit Tag-Nacht-Rhythmus. Beim Fischwasser handelte es sich um das selbst hergestellte Danieau-Medium. Um der Entwicklung von Algen und Mikroorganismen vorzubeugen, wurden maximal 100 Eier pro Petrischale gehalten und dem Medium Methylenblau zugesetzt. Des Weiteren enthielt das Standardmedium ab dem ersten Tag nach der Befruchtung PTU, um die vorzeitige Pigmentierung der Fische zu verhindern.

4.3.2 Applikation von Substanzen in das Fischwasser

Die Applikation der NP erfolgte außerhalb der Fischanlage für vier Tage. Für die kontinuierliche Exposition wurden NP zunächst für drei Tage in den Konzentrationen 1 nM und 1 μ M direkt in das Fischwasser gegeben, um die morphologische Entwicklung der Fische unter Einfluss von NP abzuschätzen. Da es hier jedoch bei der hohen Konzentration zu einem ausgeprägten Phänotyp kam, wurden die Konzentrationen angepasst. Die Applikation geschah von dort an mit den Konzentrationen 150 nM, 250 nM und 500 nM NP in das Fischwasser, welches jeden Tag erneuert wurde. Als Kontrolle diente DMSO. Die absolute Konzentration von DMSO belief sich in allen Bedingungen auf 0,1 %, so dass keine toxischen Effekte auf die Fische zu erwarten waren. Die Behandlung der Fische erfolgte jeweils von montags bis freitags, wobei an 4 dpf die Fische im EnSight-Gerät oder am 2-Photonen-Mikroskop fotografiert wurden, nachdem sie mit MS-222 betäubt wurden.

4.3.3 Auswertungen am 2-Photonen-Mikroskop, EnSight und Zeiss-Mikroskop

Alle heterozygoten Fische wurden nach Fluoreszenz vorsortiert. Für die Aufnahmen am 2-Photonen-Mikroskop (Olig2) mussten die Fische in Agarose eingebettet werden. Das Screening im EnSight Gerät erfolgte im Hochdurchsatz in schwarzen 96-Well Platten. Dafür wurden die Fische mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in die Wells überführt und das Flüssigkeitsvolumen auf 200 μ L angepasst. Fische mussten in der Mitte der Vertiefungen zentriert und anschließend kurz zentrifugiert werden, damit eine optimale Position auf der Seite stattfand und das Gerät das Rückenmark der Fische aufnehmen konnte. Für Olig2 erfolgte die Auswertung automatisch über den Algorithmus des Gerätes, CldnK musste manuell analysiert werden. Dafür wurden die Einzelbilder der Schichtaufnahmen (Stacks) in Image J zusammengefügt und alle dorsal migrierten CldnK-positiven Zellen ausgezählt. Zusätzlich wurden über den Algorithmus des EnSight-Gerätes die Längen der Zebrafische automatisch bestimmt, um etwaige Unterschiede aufgrund veränderten Größenwachstums auszuschließen.

4.3.4 Sagittalschnitte von CldnK-Zebrafischen

Zur Analyse, inwieweit eine veränderte Migration von OPCs und reifen Oligodendrocyten auf veränderte Proliferation oder Apoptose im Rückenmark zurück zu führen ist, wurden vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn (Dr. Anna Japp) 2 μ m dicke Sagittalschnitte der Zebrafische angefertigt. Hierfür wurden Fische der Linie

CldnK(cyto):eGFP ausgewählt, die mit DMSO als Kontrolle oder 500 nM NP für vier Tage behandelt wurden. Diese wurden hierfür zunächst in 4 % Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend mit spezifischen Antikörpern für Proliferation (PCNA – proliferating cell nuclear antigen) und Apoptose (c-Caspase 3 – cleaved Caspase 3) behandelt. Die POD-Reaktion führte dazu, dass ein entsprechendes Chromogen zu einem braunen Farbton umgesetzt wurde. Mithilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) erfolgte die Sichtbarmachung der feingeweblichen Strukturen der Schnitte. Es zeigte sich die typische blau-violette Färbung des Gewebshintergrundes, so dass eine Diskriminierung der apoptotischen oder proliferierenden Zellen vorgenommen werden konnte. Das Experiment wurde bislang erst einmal durchgeführt und bedarf weiterer Wiederholung, um eine Quantifizierung vornehmen zu können.

4.4 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal wiederholt. Alle statistischen Kalkulationen wurden mithilfe der GraphPad Prism 5 Software durchgeführt. Balkendiagramme und Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean – SEM) dargestellt, wobei statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit ungepaartem t-Test, drei oder mehr Gruppen hingegen mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) gefolgt vom Dunnett's *post-hoc* Test zur Ermittlung der statistischen Signifikanz analysiert wurden. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als Signifikanzniveau α festgelegt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5 Ergebnisse

5.1 Der Einfluss von NP auf die Zellviabilität und -Proliferation

Mithilfe des MTT-Assays wurde die Zellviabilität von B35-Zellen nach einer dreitägigen Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von NP bestimmt. Dieses Experiment diente der Abschätzung der Toxizität der Chemikalie und sollte die Wirkungsschwelle definieren, bei der sich die Überlebensrate der Zellen soweit senkt, dass die entsprechende Konzentration nicht mehr geeignet ist, um in weiteren Versuchen zwischen Toxizität/Apoptose und tatsächlicher Auswirkung der NP auf neuronale Prozesse diskriminieren zu können. Abbildung 5 informiert über den Einfluss von NP auf das Überleben der B35-Zellen.

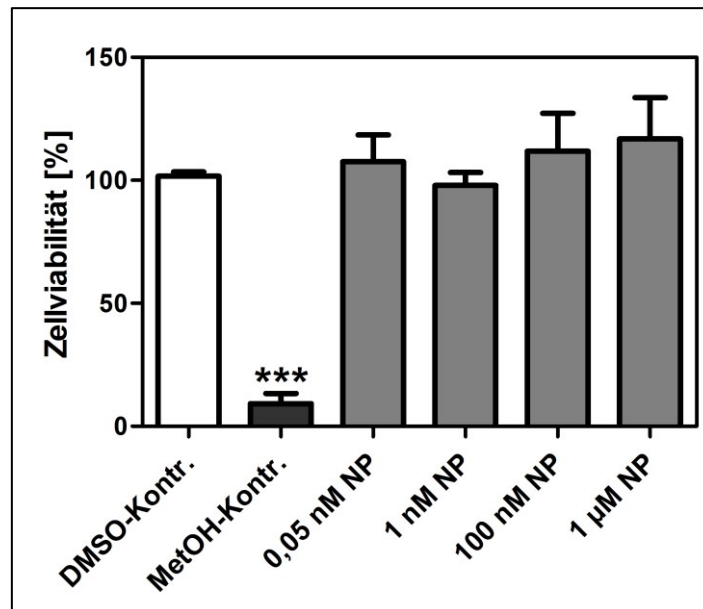


Abbildung 5: Zellviabilität von B35-Zellen unter Einfluss von NP

B35-Zellen wurden für 72 Stunden mit NP oder den entsprechenden Kontrollen behandelt und anschließend die Zellviabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der DMSO-Kontrolle wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der Behandlungen darauf bezogen. Die Werte von drei unabhängigen Experimenten wurden kombiniert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *** $p < 0,001$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; MetOH-Kontr. – Methanol-Kontrolle; NP - Nonylphenol

Es ist zu erkennen, dass die dreitägige Behandlung von B35-Zellen mit verschiedenen NP-Konzentrationen zwischen 0,05 nM und 1 μ M keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatte. Die Überlebensfähigkeit lag jeweils bei 107,8 % \pm 10,87 %, 97,92 % \pm 5,28 %, 111,8 % \pm 15,46 % und 116,8 % \pm 16,88 % nach der Behandlung mit 0,05, 1, 100 oder 1000 nM NP. Die

Zellüberlebensfähigkeit der Negativ-Kontrolle wurde auf 100 % festgelegt und DMSO-behandelte Zellen wiesen eine Zellviabilität von $100 \% \pm 1,76 \%$ auf. Weiterhin lässt sich feststellen, dass in Methanol-behandelten Zellen ein signifikant höheres Zellsterben zu beobachten war, was auf die Funktionalität des Assays hinweist. Hier lag die Überlebensfähigkeit nur noch bei $9,17 \% \pm 4,17 \%$. Bei allen weiteren Experimenten können toxische Effekte durch NP in einem Konzentrationsbereich bis $1 \mu\text{M}$ ausgeschlossen werden. Inwieweit Zellen sich jedoch in einem Frühstadium der Apoptose befinden, kann mit diesem Testsystem nicht abgeschätzt werden.

Mithilfe des EdU-Assays wurde die Teilungsrate von B35-Zellen unter Einfluss von NP ermittelt. Hierfür wurden die Zellen für drei Tage mit DMSO als Kontrolle bzw. 1 nM oder $1 \mu\text{M}$ NP für drei Tage behandelt. Da bekannt ist, dass das Differenzierungsreagenz (db) cAMP in Opti-MEM® Medium zu einem Proliferationsstopp der Zellen führt, diente dies als Positiv-Kontrolle zur Validierung des Assays. Abbildung 6 zeigt, dass die Proliferationsrate bei B35-Zellen, die mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden, bei $31,46 \% \pm 1,27$ liegt. Eine Behandlung mit 1 nM NP führt zu einer Reduktion der Proliferationsrate um $23,70 \% \pm 4,40 \%$ im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Hier teilen sich die Zellen nur noch zu $24,00 \% \pm 1,38 \%$. Kein signifikanter Effekt in Bezug auf die Teilungsrate konnte bei der höheren NP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ beobachtet werden, die bei $31,66 \% \pm 1,21 \%$ lag. Unter dem Einfluss von cAMP, welches die Zellen differenziert und damit die Proliferationsphase unterbricht, teilen sich die B35-Zellen nur noch zu $1,61 \% \pm 0,48 \%$, was darauf hindeutet, dass die Bestimmung der Proliferationsrate über das EdU-Reagenz funktionell ist.

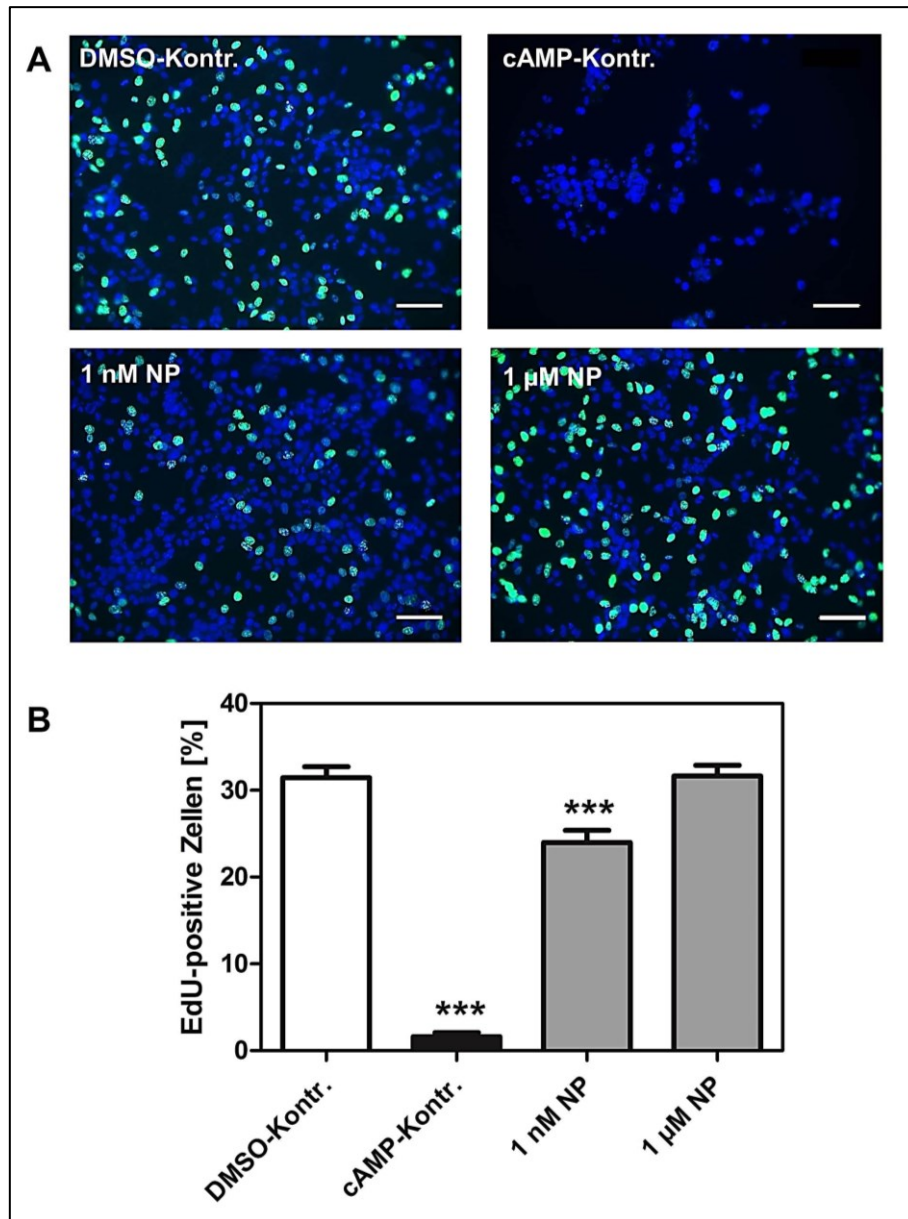


Abbildung 6: Proliferationsrate von B35-Zellen unter Einfluss von NP

B35-Zellen wurden für 72 Stunden mit DMSO als Negativkontrolle, (db) cAMP als Positivkontrolle oder 1 nM bzw. 1 µM NP behandelt und anschließend die Proliferationsrate aus der Anzahl EdU-positiver Zellen in Bezug auf die Gesamtanzahl an Zellen bestimmt. **(A)** Repräsentative, übereinander gelagerte Bilder von EdU- (grün) und Hoechst 33342- Färbungen (blau) von DMSO-, cAMP- oder NP-behandelten B35-Zellen. Maßstabsbalken, 50 µm **(B)** Quantifizierung der B35-Zellproliferation aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen beziehen sich auf den Unterschied zur DMSO-Kontrolle, die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. *** $p < 0,001$. CAMP-Kontr. – cAMP-Kontrolle; DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP - Nonylphenol

5.2 Der Einfluss von NP auf die morphologische Differenzierung von B35-Zellen

Der Vorgang der Differenzierung bezeichnet einen Prozess, der *in vivo* zur Ausprägung phänotypischer Eigenschaften funktionell voll entwickelter Zellen führt. Er ist eine Kombination aus konstitutiven und adaptiven Eigenschaften einer reifen Zelle. Als Marker der Differenzierung von Neuronen *in vitro* kann die Messung der Neuritenlänge herangezogen werden. Als Bestandteil des Differenzierungsprozesses bilden die Zellen lange Neuriten, deren Größe sich signifikant von denen undifferenzierter Zellen unterscheidet. Die Anwesenheit von Chemikalien kann die Differenzierung und Plastizität neuronaler Prozesse und Verbindungen beeinflussen. Um die Auswirkungen von NP auf die morphologische Differenzierung von Nervenzellen zu bestimmen, wurde die Länge der Zellfortsätze von B35-Neuroblastomzellen bestimmt. Hierbei handelte es sich um das Integrin-unabhängige und zellautonome Neuritenwachstum. Weiterhin kann die Messung der Anzahl von Neuriten genutzt werden, um den Differenzierungsgrad einer Zelle zu bestimmen. Durch erhöhte Verzweigungen ändern sich die Zell-Zell Kontakte und die Innervation. Da in Zellkulturen nicht zwischen Axonen und Dendriten unterschieden werden kann, ist im Folgenden unter dem Begriff Neurit die Gesamtzahl aller Zellfortsätze zusammengefasst.

5.2.1 NP-Gemisch

B35-Zellen wurden für drei oder 11 Tage mit einem technischen NP-Gemisch behandelt und nach dieser Inkubationszeit die Länge der Neuriten bestimmt. In vorangegangenen Experimenten von C. Laurini (AG Diestel) wurden bereits höhere Konzentrationen des NP-Gemisches an B35-Zellen getestet (Daten nicht gezeigt). Es offenbarte sich eine signifikante Reduktion der Neuritenlängen bereits ab einer Konzentration von 1 nM NP. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer sehr geringen Konzentration von 0,05 nM NP gearbeitet, deren Effekt in der Literatur so noch nie beschrieben wurde. Hierfür wurden sowohl undifferenzierte, als auch differenzierte Zellen verwendet, um einen Einfluss auf verschiedene neuronale Entwicklungsstadien zu simulieren (Abbildung 7A, B). Nach drei Tagen NP-Inkubation ließ sich eine signifikante Reduktion der Neuritenlängen bei undifferenzierten B35-Zellen ermitteln (Abbildung 7C). Dabei lag die durchschnittliche Länge der Neuriten von unbehandelten Zellen bei $29,29 \mu\text{m} \pm 1,41 \mu\text{m}$, was eine Reduktion von $20,83 \% \pm 5,77 \%$ auf $23,19 \mu\text{m} \pm 1,69 \mu\text{m}$ von NP-behandelten Zellen bedeutete. Keine signifikante Reduktion der Neuritenlänge wurde bei differenzierten Zellen gemessen, obgleich auch hier eine Tendenz in Richtung kürzerer Neuriten sichtbar war. Die

durchschnittliche Neuritenlänge von DMSO-behandelten Zellen lag bei $70,20 \mu\text{m} \pm 4,27 \mu\text{m}$, die der NP-behandelten bei $56,24 \mu\text{m} \pm 6,05 \mu\text{m}$, was eine Reduktion um $18,89 \% \pm 8,61 \%$ bedeutet. Weiterhin ist in Abbildung 7D an der exemplarischen Verteilungskurve der Neuritenlängen erkennbar, dass sowohl bei differenzierten als auch undifferenzierten B35-Zellen die Zellfortsätze nach Inkubation der Zellen mit NP insgesamt prozentual kürzer sind und sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf ergibt.

Nach einer langen Inkubationszeit von 11 Tagen verschob sich die Reduktion der Zellfortsätze jedoch auch bei differenzierten Zellen in Richtung signifikanter Unterschiede zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 7E). Es lässt sich beobachten, dass eine Behandlung mit $0,05 \text{ nM}$ NP nach 11 Tagen zu einer signifikanten Verkürzung der Neuriten in undifferenzierten und differenzierten B35-Zellen führte. Die durchschnittliche Länge der undifferenzierten, DMSO-behandelten Zellen lag nach 11 Tagen bei $42,65 \mu\text{m} \pm 2,97 \mu\text{m}$, bei NP-behandelten Zellen bei $32,03 \mu\text{m} \pm 2,15 \mu\text{m}$. Die Neuritenlängen von differenzierten, NP-behandelten Zellen verkürzten sich von $67,51 \mu\text{m} \pm 3,67 \mu\text{m}$ auf $53,24 \mu\text{m} \pm 3,68 \mu\text{m}$. Neuriten bei undifferenzierten Zellen sind dabei um $24,90 \% \pm 5,04 \%$, bei differenzierten Zellen um $21,14 \% \pm 5,45 \%$ kürzer. Es kann konstatiert werden, dass ein NP-Gemisch mit unbekannter Isomeren-Zusammensetzung einen zeit- und dosisabhängigen Effekt auf die B35-Neuroblastomzelllinie ausübt.

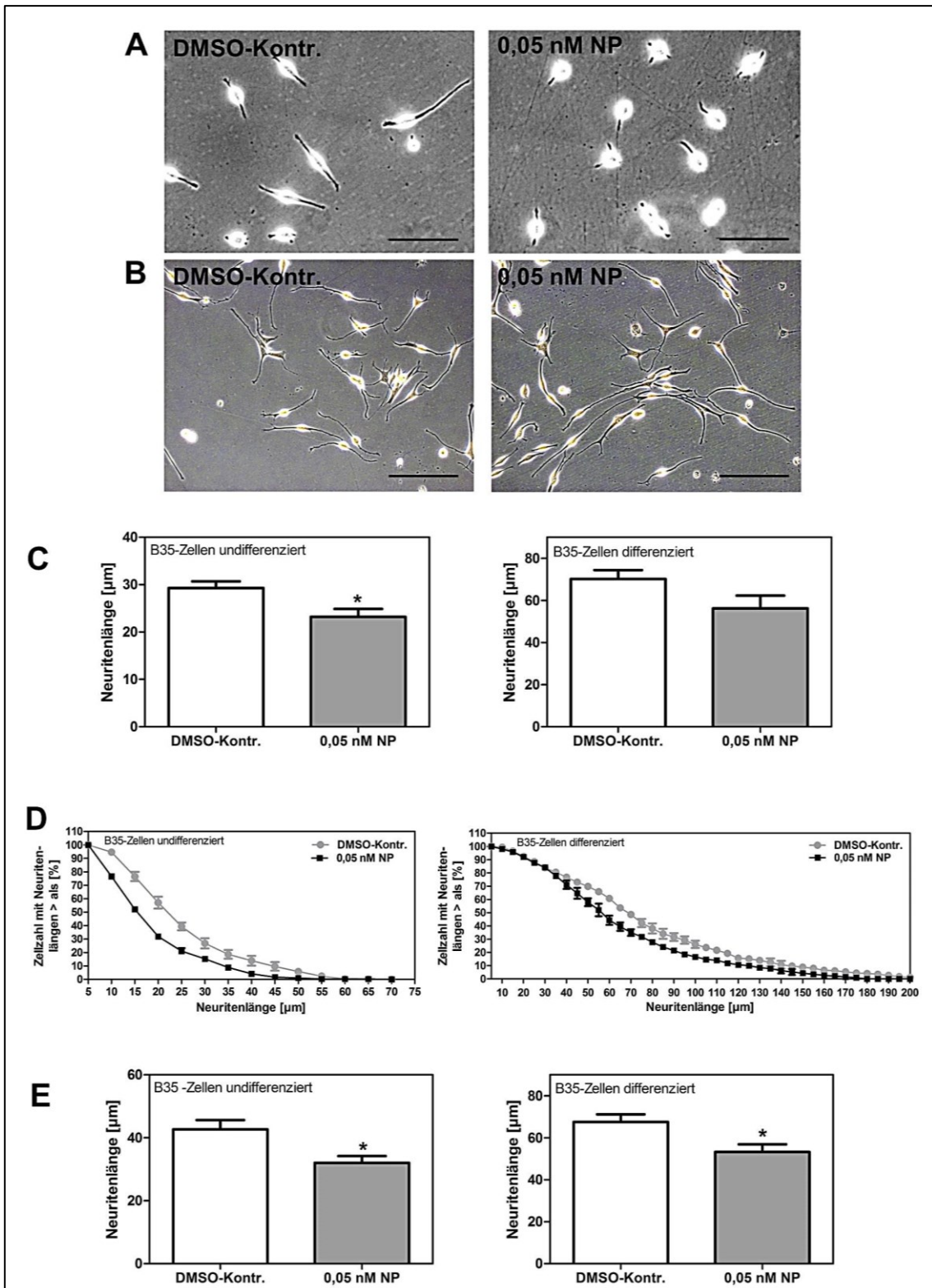


Abbildung 7: Der Einfluss von NP auf die Neuritenlänge von B35-Zellen

Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von undifferenzierten (**A**) und differenzierten (**B**) B35-Zellen nach Behandlung mit DMSO als Kontrolle oder 0,05 nM NP nach drei Tagen. Maßstabsbalken, 100 μ m. Statistische Auswertung der durchschnittlichen Neuritenlängen (**C**) und Verteilungskurven (**D**) nach dreitägiger Behandlung von undifferenzierten und differenzierten B35-Zellen mit DMSO als Kontrolle oder 0,05 nM NP. (**E**) Die Auswertung der durchschnittlichen Neuritenlängen nach 11-tägiger Behandlung von B35-Zellen ist als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Des Weiteren wurde bestimmt, welchen Einfluss eine dreitägige Inkubation mit NP auf die Anzahl von Neuriten, ausgehend vom Zellsoma, bei differenzierten und undifferenzierten B35-Zellen hat. Abbildung 8 zeigt, dass die durchschnittliche Anzahl an Neuriten unter der Inkubation mit NP keiner Änderung erfährt. Bei undifferenzierten Zellen tragen ca. 21 DMSO-behandelte und 23 NP-behandelte Zellen nur einen Neuriten, der länger als 5 μm ist. Die meisten Zellen tragen zwei bis drei Zellfortsätze, unabhängig von der Behandlung (undifferenzierte Zellen: 72 Zellen bei DMSO-Behandlung; 78 Zellen bei NP-Behandlung), wobei sich dies bei differenzierten Zellen in Richtung von zwei Neuriten verschiebt. Hier tragen, im Unterschied zu undifferenzierten Zellen, weniger Zellen mehr als zwei Neuriten. Auch hier gibt es jedoch keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

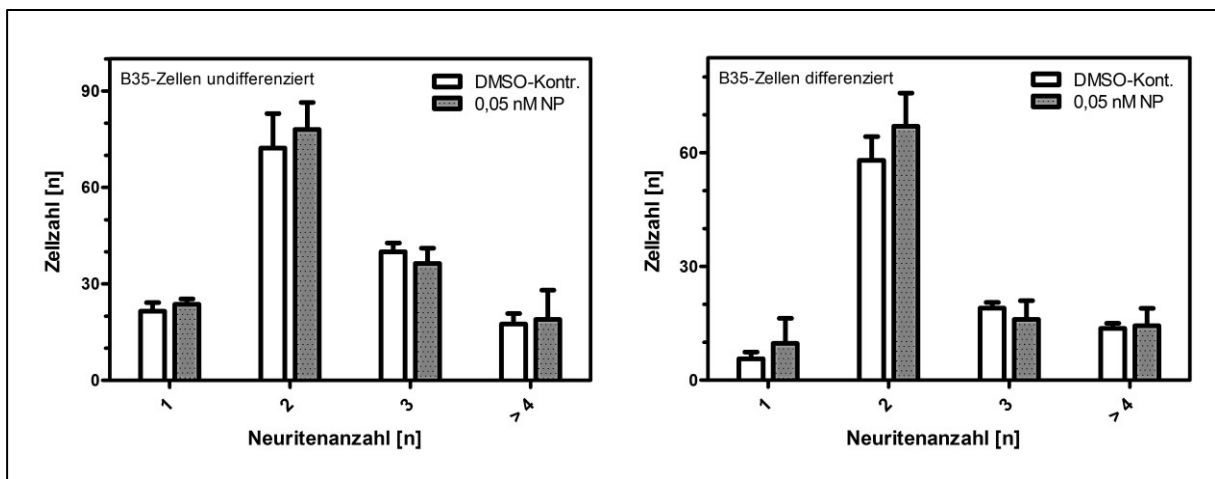


Abbildung 8: Der Einfluss von NP auf die Neuritenanzahl von B35-Zellen

Die statistische Auswertung der durchschnittlichen Anzahl an Neuriten pro Zelle nach dreitägiger Behandlung von undifferenzierten (links) und differenzierten (rechts) B35-Zellen mit DMSO als Kontrolle oder 0,05 nM NP ist als Mittelwert \pm SEM angegeben. DMSO-Kont. – DMSO-Kontrolle; NP - Nonylphenol

5.2.2 NP-Isomere NP65, NP111 und NP112

Bislang gibt es keine Studien darüber, wie sich einzelne NP-Isomere auf die Entwicklung des Nervensystems auswirken. Diese könnten, isoliert eingesetzt, verstärkt oder abgeschwächt in Bezug auf das Auswachsen von Neuriten agieren. Die drei synthetisierten und charakterisierten Isomere NP65, NP111 und NP112 wurden in diese Experimente eingeschlossen und auf ihre Effekte bezüglich des Neuritenwachstums der B35-Zellen hin getestet. Hierfür wurden die Zellen für drei oder 11 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der Isomere behandelt und die Länge der Neuriten, wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben, analysiert. Da es bislang keine verfügbaren Daten zur Wirkung der Isomere gibt, wurde ein Konzentrationsbereich von 0,05 nM bis 1 μ M bei den Kurzzeitversuchen abgedeckt. Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die Auswirkungen der NP-Isomere auf differenzierte und undifferenzierte Zellen nach drei- bzw. 11-tägiger Inkubation. Die Auswertungen ergaben, dass Isomere unterschiedliche Dosis-Wirkungsbeziehungen haben. Während die Neuriten der mit NP65 und NP111 behandelten Zellen sich bei einer dreitägigen Inkubation mit steigender Konzentration verkürzen und dies bei NP65 ab 1 μ M und bei NP111 ab 100 nM signifikant, konnte bei NP112 keine Abhängigkeit zwischen Konzentration und Einfluss auf das Auswachsen der Neuriten ermittelt werden (Abbildung 9). Für das Isomer 65 ergaben sich bei undifferenzierten B35-Zellen folgende Neuritenlängen: 25,24 μ m \pm 3,14 μ m, 24,81 μ m \pm 0,86 μ m, 23,45 μ m \pm 1,21 μ m und 20,22 μ m \pm 1,36 μ m (0,05; 1; 100; 1000 nM NP). Das Isomer NP65 verringerte die Länge der Neuriten von undifferenzierten Zellen bei einer Konzentration von 1 μ M mit einer Reduktion um 28,55 % \pm 4,82 %. Die Quantifizierung der Neuritenlängen undifferenzierter B35-Zellen, die mit NP111 behandelt wurden, ergab folgende Werte: 20,77 μ m \pm 1,12 μ m, 20,40 μ m \pm 1,25 μ m, 19,06 μ m \pm 1,58 μ m und 17,22 μ m \pm 1,16 μ m (0,05; 1; 100; 1000 nM NP). Bei dem Isomer 111 zeigte eine Inkubation mit 100 nM eine signifikante Reduktion der Neuritenlänge undifferenzierter Zellen um 27,99 % \pm 5,89 % und bei 1 μ M um 34,95 % \pm 4,40 %. NP112 änderte die Neuritenlänge von undifferenzierten Zellen nicht signifikant, Werte bewegten sich kurz oberhalb oder unterhalb des Mittelwerts der unbehandelten B35-Zellen, welcher bei 23,28 μ m \pm 1,33 μ m lag. Die Länge der Zellfortsätze NP112-behandelter, undifferenzierter Zellen konnte mit diesen Werten beziffert werden: 22,82 μ m \pm 2,17 μ m, 19,37 μ m \pm 1,39 μ m, 19,40 μ m \pm 1,39 μ m und 21,00 μ m \pm 1,18 μ m (0,05; 1; 100; 1000 nM NP). Des Weiteren zeigte sich, dass keines der Isomere in der Lage war, das Auswachsen der Neuriten differenzierter Zellen nach einer dreitägigen Inkubationszeit signifikant zu beeinflussen.

Neuritenlängen differenzierter B35-Zellen unter dem Einfluss von NP65 waren $49,56 \mu\text{m} \pm 7,15 \mu\text{m}$, $51,28 \mu\text{m} \pm 5,27 \mu\text{m}$, $47,56 \mu\text{m} \pm 4,05 \mu\text{m}$ und $37,18 \mu\text{m} \pm 5,50 \mu\text{m}$ (0,05; 1; 100; 1000 nM NP); von NP111 $53,26 \mu\text{m} \pm 5,37 \mu\text{m}$, $52,29 \mu\text{m} \pm 4,07 \mu\text{m}$, $45,08 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$ und $47,31 \mu\text{m} \pm 3,21 \mu\text{m}$ (0,05; 1; 100; 1000 nM NP); sowie NP112 $48,33 \mu\text{m} \pm 2,77 \mu\text{m}$, $52,98 \mu\text{m} \pm 4,62 \mu\text{m}$, $47,31 \mu\text{m} \pm 3,82 \mu\text{m}$ und $41,62 \mu\text{m} \pm 0,97 \mu\text{m}$ (0,05; 1; 100; 1000 nM NP).

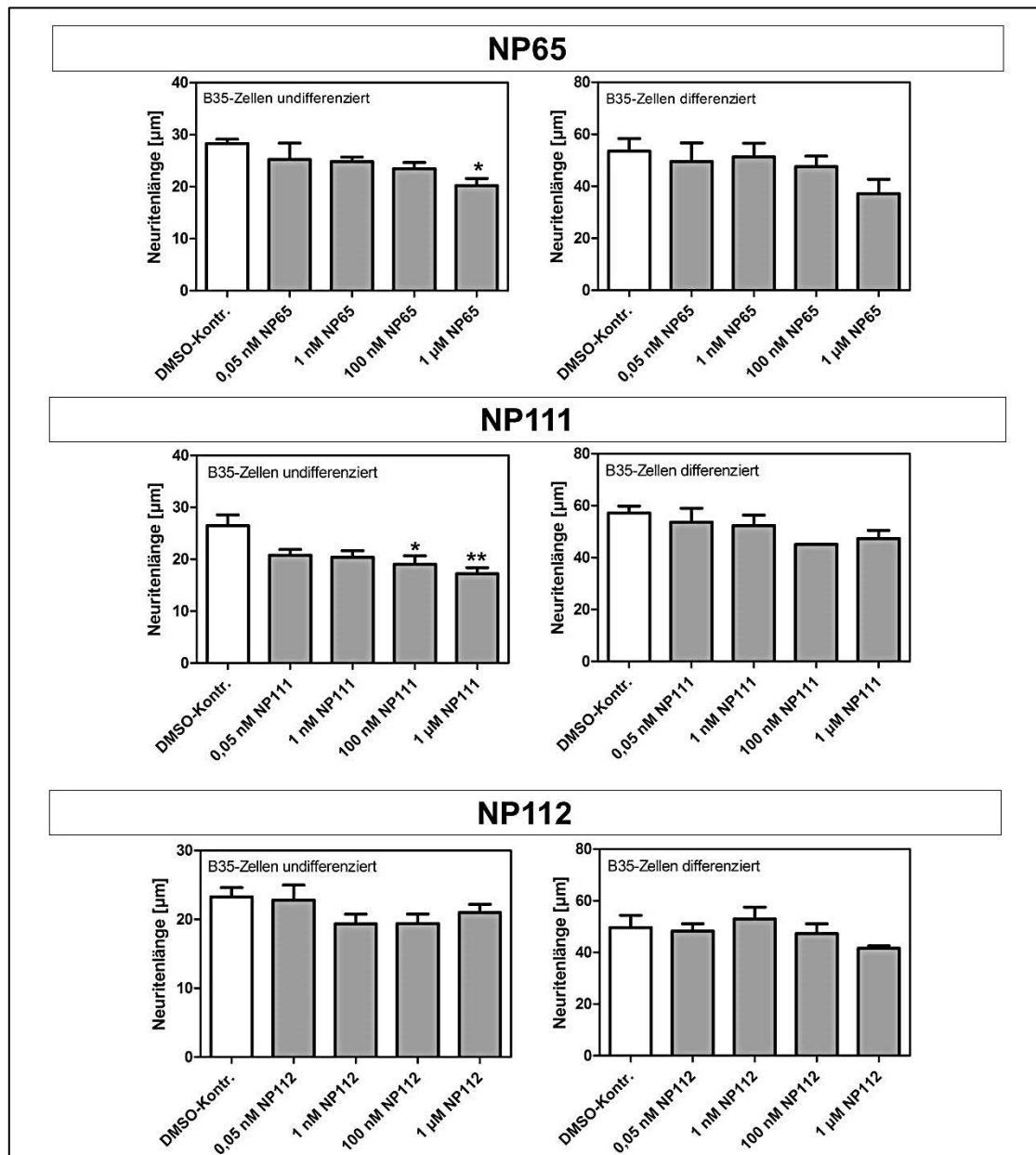


Abbildung 9: Der Einfluss unterschiedlicher NP-Isomere nach drei Tagen Inkubation auf die Neuritenlänge von B35-Zellen

Undifferenzierte oder mit (db) cAMP differenzierte B35-Zellen wurden für drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der NP-Isomere 65, 111 oder 112 behandelt. Die Quantifizierung der Neuritenlängen von drei unabhängigen Experimenten ist als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Da davon ausgegangen werden muss, dass Menschen der Umweltchemikalie über einen längeren Zeitraum ausgesetzt sind, wurden auch hier Langzeiteffekte der Isomere eruiert. Nach einer langen Inkubationszeit von 11 Tagen konnte keines der Isomere, weder bei undifferenzierten, noch bei differenzierten Zellen, die Länge der Neuriten signifikant verkürzen, auch wenn Tendenzen bei NP65 und NP111 sichtbar waren (Abbildung 10). Die durchschnittlichen Neuritenlängen von undifferenzierten Zellen, welche mit DMSO als Kontrolle bzw. NP65 für 11 Tage behandelt wurden, lagen bei $34,56 \mu\text{m} \pm 5,75 \mu\text{m}$, $30,02 \mu\text{m} \pm 7,09 \mu\text{m}$ und $27,97 \mu\text{m} \pm 4,97 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP). Dies bedeutet eine durchschnittliche Reduktion der mittleren Neuritenlänge um $13,14 \% \pm 20,53 \%$ bei 0,05 nM NP und $19,07 \% \pm 14,46 \%$ bei 100 nM NP. Differenzierte Zellen zeigten Neuritenlängen von $77,91 \mu\text{m} \pm 9,26 \mu\text{m}$, $52,12 \mu\text{m} \pm 6,37 \mu\text{m}$ und $53,40 \mu\text{m} \pm 4,28 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP). Dies bedeutet eine durchschnittliche Reduktion der mittleren Neuritenlänge bei 0,05 nM um $33,10 \% \pm 8,30 \%$ und bei 100 nM um $31,46 \% \pm 5,49 \%$. Bei dem Isomer NP111 lassen sich ähnliche Tendenzen bei exponierten Zellen in Richtung kürzerer Neuriten aufzeigen. Die durchschnittliche Länge der Zellfortsätze undifferenzierter B35-Zellen lag bei $34,34 \mu\text{m} \pm 9,56 \mu\text{m}$, $28,06 \mu\text{m} \pm 3,96 \mu\text{m}$ und $22,71 \mu\text{m} \pm 3,71 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP), was eine Reduktion um $18,29 \% \pm 11,52 \%$ bzw. $33,87 \% \pm 10,80 \%$ ist; bei differenzierten Zellen lag sie bei $73,89 \mu\text{m} \pm 8,76 \mu\text{m}$, $59,05 \mu\text{m} \pm 7,01 \mu\text{m}$ und $53,07 \mu\text{m} \pm 4,22 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP). Lediglich das Isomer NP112 führte dazu, dass die durchschnittliche Neuritenlänge differenzierter Zellen nach der 11-tägigen Inkubation leicht erhöht war, wenn auch nicht signifikant. Dies könnte daran liegen, dass in diesem Fall die Länge unbehandelter Zellen deutlich geringer ausfiel als bei Experimenten mit anderen Isomeren, so dass der Unterschied zur DMSO-Kontrolle positiv ausfällt. Die Werte lagen hier bei $47,81 \mu\text{m} \pm 4,43 \mu\text{m}$, $53,85 \mu\text{m} \pm 2,01 \mu\text{m}$ und $57,52 \mu\text{m} \pm 2,07 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP). Die Quantifizierung der Neuritenlängen undifferenzierter Zellen ergab folgende Werte für das Isomer NP112: $24,46 \mu\text{m} \pm 5,18 \mu\text{m}$, $20,26 \mu\text{m} \pm 4,88 \mu\text{m}$ und $22,61 \mu\text{m} \pm 3,75 \mu\text{m}$ (DMSO; 0,05; 100 nM NP).

Zusammengefasst kann konstatiert werden, dass NP-Isomere ein differenziertes Wirkungsspektrum in Bezug auf Dosis und Inkubationsdauer auf das Auswachsen von Neuriten in B35-Zellen haben, wobei das Isomer NP112 keine signifikanten Effekte zeigte.

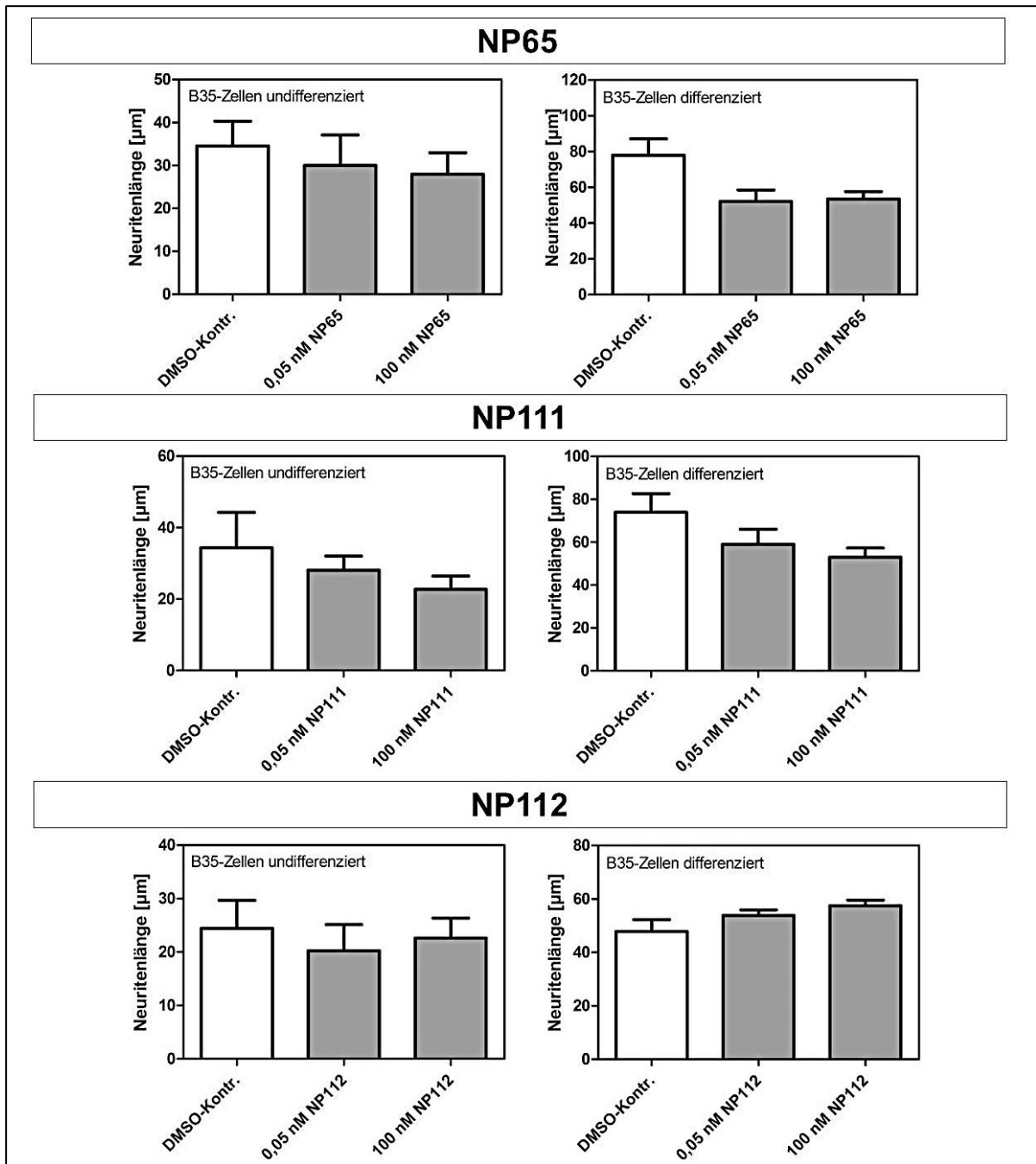


Abbildung 10: Der Einfluss unterschiedlicher NP-Isomere nach 11 Tagen Inkubation auf die Neuritenlänge von B35-Zellen

Undifferenzierte oder mit (db) cAMP differenzierte B35-Zellen wurden für 11 Tage mit den NP-Isomeren 65, 111 oder 112 behandelt. Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten ist als Mittelwert \pm SEM angegeben. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP - Nonylphenol

5.3 Der Einfluss von NP auf die morphologische Differenzierung von Primärneuronen

Zur Verifizierung der Ergebnisse, die in der B35-Neuroblastomzelllinie erzielt wurden, erfolgte im Anschluss die Behandlung von Kleinhirnneuronen mit einem NP-Gemisch. Ein Teil der Primärzellen wurde mit dem Lebendfarbstoff DiI behandelt. Dies diente der Sichtbarmachung der Zellausläufer, da diese auf PLL in der Regel stark verzweigte Netzwerke bilden, so dass eine Diskriminierung einzelner Neuriten schwierig ist. In diesem Fall wurde das Zell-Zell-abhängige Neuritenwachstum untersucht. Ein repräsentatives Bild der DiI-gefärbten Neuronen ist in Abbildung 11A zu sehen. Die Auswertung der Zellfortsätze geschah wie in Abschnitt 4.1.10 beschrieben. Die Analyse der Neuritenlängen nach drei Tagen Inkubation zeigte, dass mit DMSO als Negativkontrolle behandelte Zellen keine signifikant längeren Neuriten aufwiesen als mit NP behandelte, auch wenn eine leichte Tendenz sichtbar war (Abbildung 11B). Die durchschnittliche Neuritenlänge der unbehandelten Zellen lag nach drei Tagen bei $82,48 \mu\text{m} \pm 10,94 \mu\text{m}$, wohingegen die Neuriten der NP-behandelten Neuronen bei $72,10 \mu\text{m} \pm 7,48 \mu\text{m}$ bei 1 nM und $67,11 \mu\text{m} \pm 10,64 \mu\text{m}$ bei 10 nM lagen. Obschon eine Tendenz sichtbar war, ergab die statistische Auswertung nach drei Tagen noch keine signifikanten Unterschiede der Werte. Im Gegensatz dazu hatte eine längere Inkubation mit NP von 11 Tagen einen signifikanten Einfluss auf die morphologische Differenzierung der Primärzellen, sichtbar an deutlich kürzeren Zellfortsätzen sowohl bei der niedrigen, als auch höheren NP-Konzentration. Die durchschnittlichen Neuritenlängen der Kleinhirnneuronen beliefen sich in der Negativkontrolle auf $93,75 \mu\text{m} \pm 3,07 \mu\text{m}$, $70,76 \mu\text{m} \pm 3,62 \mu\text{m}$ bzw. $68,38 \mu\text{m} \pm 3,30 \mu\text{m}$ (DMSO; 1 nM; 10 nM NP). NP induzierte eine durchschnittliche Reduktion der mittleren Neuritenlänge um $24,52 \% \pm 3,86 \%$ (1 nM) bzw. $27,05 \% \pm 3,52 \%$ (10 nM).

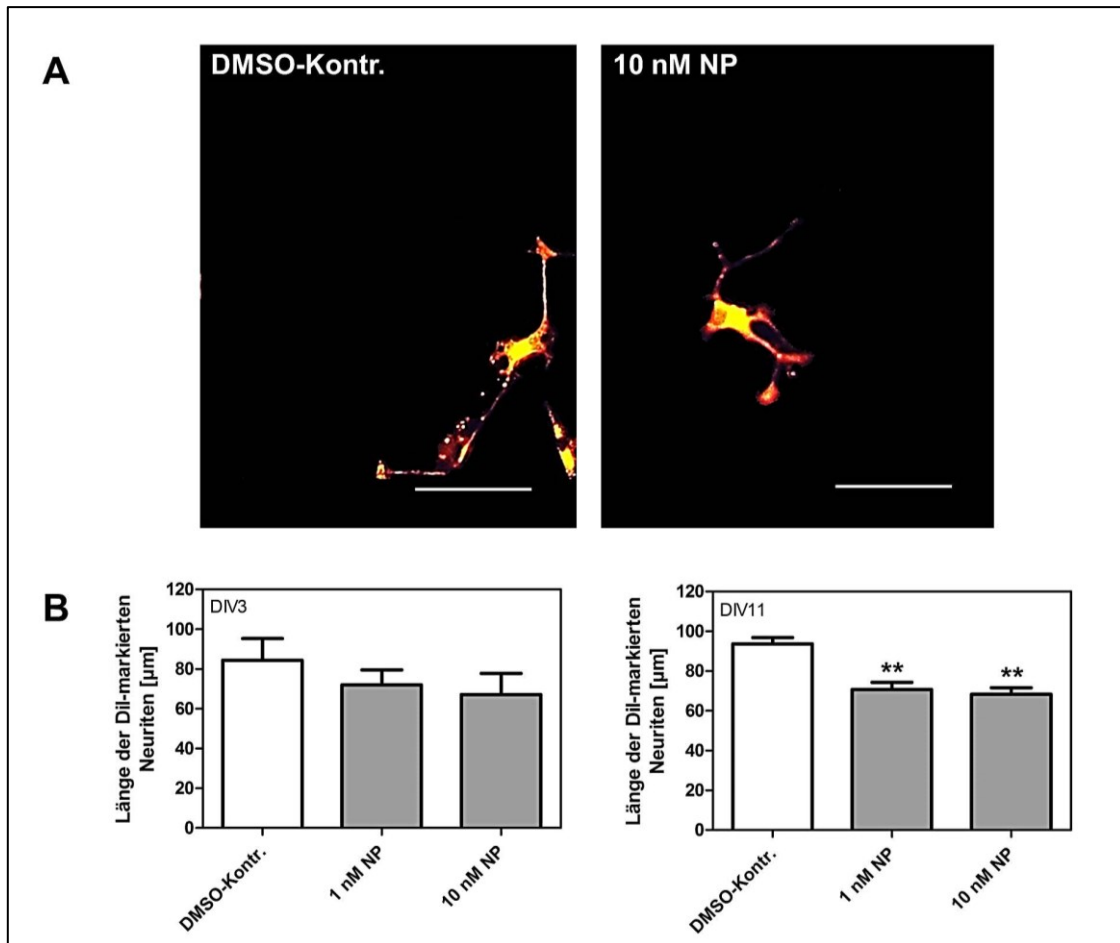


Abbildung 11: Der Einfluss von NP auf die Neuritenlänge DiI-gefärbter Kleinhirnneuronen

Cerebellare Neuronen wurden aus P3/4 Wildtypmäusen isoliert und unter Anwesenheit von NP oder DMSO als Kontrolle für drei bzw. 11 Tage kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde mit dem Lebendfarbstoff DiI gefärbt und die Länge der Neuriten bestimmt. **(A)** Repräsentative Aufnahmen von DiI-gefärbten Kleinhirnneuronen. Maßstabsbalken, 100 μm . **(B)** Quantitative Auswertung der Länge der Zellausläufer nach drei (links) bzw. 11 Tagen Inkubation (rechts) mit 1 oder 10 nM NP. Die Werte von drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, Signifikanzen beziehen sich auf die DMSO-Kontrolle. ** $p < 0,01$. DIV – days *in vitro*; DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP - Nonylphenol

5.4 Der Einfluss von NP auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten

Ein charakteristisches Merkmal zahlreicher neuronaler Vorläuferzellen ist, dass sie von dem Ort, an dem sie sich zu differenzieren beginnen, wegwandern. Verschiedene Klassen von Neuroblasten wandern in verschiedenen Stadien, einige vor der Ausbildung ihrer Axone, andere danach. Die Wanderung neuronaler Vorläuferzellen hat zum einen die Funktion, dass sie zur Ausbildung der Identität der Nervenzellen führt, zum anderen kann sie die funktionellen Eigenschaften und künftigen Verschaltungen des Neurons bestimmen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von NP auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der B35-Neuroblastomzellen bestimmt.

5.4.1 Migration

5.4.1.1 Wundheilungsassay

Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens von B35-Zellen in An- oder Abwesenheit von NP wurde der Scratch-Assay durchgeführt. Zellen schließen nach einer spezifischen Zeit, die für jede Zelllinie individuell ist, die entstandene Lücke. Abbildung 12A zeigt repräsentative Aufnahmen einer solchen Wunde nach 24 Stunden. Die statistische Auswertung der Wundbreite behandelter und unbehandelter B35-Zellen ermittelte, dass das Migrationspotential unter dem Einfluss von NP erhöht ist und dies in einer Dosis-Wirkungsabhängigkeit (Abbildung 12B).

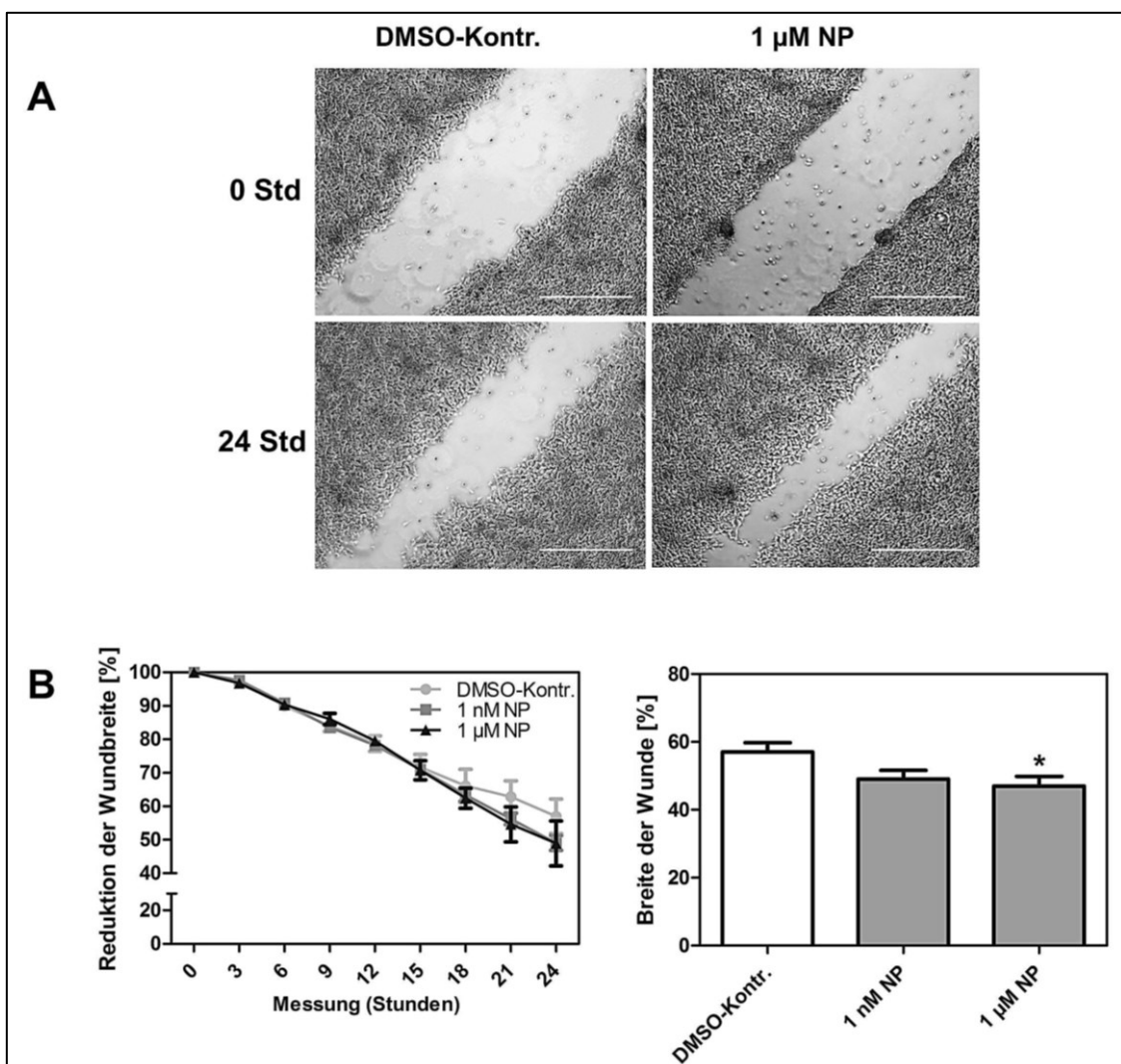


Abbildung 12: Der Einfluss von NP auf die Wundbreite des B35-Monolayers im Scratch-Assay

B35-Zellen wurden für drei Tage mit DMSO als Kontrolle bzw. 1 nM oder 1 µM NP behandelt, bevor der „Scratch“ zugefügt wurde. **(A)** Repräsentative Aufnahmen der Migration von B35-Zellen in eine Wunde nach null und 24 Stunden. Maßstabsbalken 500 µm. **(B)** Vergleich der prozentualen Reduktion der Wundbreite über die Zeit (links) und statistische Auswertung der Wundbreite nach 24 Stunden (rechts). Signifikanzen beziehen sich auf den Mittelwert ± SEM. *p < 0,05. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol; Std – Stunden

Während die Kontrollzellen die Wunde nach 24 Stunden auf $57,01 \% \pm 4,87 \%$ schlossen, lag die Wundbreite von NP-behandelten Zellen nach dieser Zeitspanne nur noch bei $49,05 \% \pm 2,57 \%$ bzw. $46,97 \% \pm 2,85 \%$ ($1; 1000 \text{ nM NP}$) im Vergleich zum Beginn der Messung. Behandelte Zellen schlossen die Lücke also schneller und dies bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M NP}$ mit einem p-Wert unter $0,05$ statistisch signifikant. Da 24 Stunden vor Beginn der Messung das FCS aus dem Kulturmedium entfernt wurde, ist davon auszugehen, dass es sich um einen migrativen und nicht proliferativen Effekt handelt. Dies ist umso wahrscheinlicher, da der EdU-Assay (siehe Abbildung 6) ebenfalls keine erhöhte Proliferationsrate datiert hat.

5.4.2 Adhäsion

Änderungen in der Zellmigration hängen immer mit einem veränderten Adhäsionsverhalten zusammen. Aus diesem Grund wurde ein Adhäsionstest mittels Crystal Violet durchgeführt. Hierbei erfolgte die Kultivierung der B35-Zellen für drei Tage in Anwesenheit von 1 nM oder $1 \mu\text{M NP}$ bzw. DMSO als Kontrolle. Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, steigt das Adhäsionspotential von Zellen, welche mit NP behandelt wurden, deutlich an. Nach 30 Minuten Adhäsionszeit liegt das Potential von unbehandelten Zellen bei $0,52 \pm 0,03$, von 1 nM NP behandelten Zellen bei $0,70 \pm 0,09$ und von $1 \mu\text{M NP}$ behandelten Zellen bei $1,07 \pm 0,15$. Die Adhäsion ist bei 1 nM NP nach 60 Minuten auf $140 \% \pm 10,03 \%$ und bei $1 \mu\text{M NP}$ sogar auf $215 \% \pm 23,91 \%$ angestiegen. Die hohe NP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ führt also zu signifikant verstärkter Zelladhäsion nach 30 und 60 Minuten.

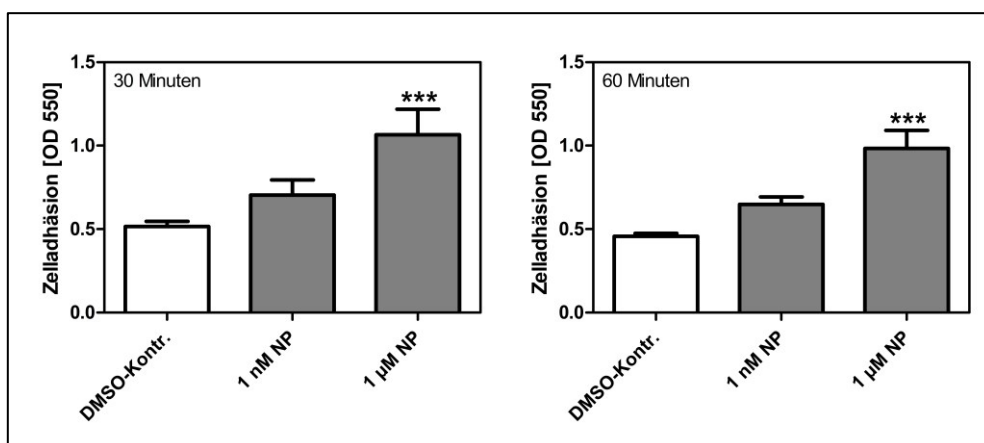


Abbildung 13: Der Einfluss von NP auf das Adhäsionspotential von B35-Zellen

Quantitative Auswertung der Zelladhäsion nach drei Tagen Inkubation mit 1 nM oder $1 \mu\text{M NP}$, nachdem sich B35-Zellen für 30 (links) bzw. 60 Minuten (rechts) absetzen konnten. Die Werte von drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, Signifikanzen beziehen sich auf die DMSO-Kontrolle. *** $p < 0,001$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol; OD – optische Dichte

5.4.3 Sphäroid-Formation und -Migration

Der Wundheilungsassay repräsentiert nicht exakt die menschliche Gehirnmatrix und die natürliche Umwelt, in welcher die Zellen normalerweise migrieren. Die Anwendung verschiedener Migrationsassays und der Vergleich der Ergebnisse eröffnet jedoch die Möglichkeit, das Migrationsverhalten der B35-Zellen genauer zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde ein Zellkultursystem angewendet, welches es den Zellen erlaubt zu proliferieren und frei-schwimmende, multipotente Zellhaufen, Neurosphäre genannt, zu bilden. Wie Abbildung 14 indiziert, sind Sphäroide, welche für ein bis zwei Tage mit 1 μM NP behandelt wurden, signifikant größer im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen. Für die geringere NP-Konzentration von 1 nM ist ebenfalls eine Tendenz in Richtung größerer Sphäroide sichtbar. Bereits nach einem Tag haben Sphäroide unbehauelter Zellen eine Größe von $77.455 \text{ px} \pm 4.347 \text{ px}$ sowie Zellen, die mit NP behandelt wurden, eine Größe von $82.154 \text{ px} \pm 4.293 \text{ px}$ bzw. $96.542 \text{ px} \pm 6.280 \text{ px}$ (1; 1000 nM NP). Nach zwei Tagen ist der Effekt der höheren NP-Konzentration auf die Größe der Sphäroide im Vergleich zu unbehauelten Sphäroide noch immer signifikant.

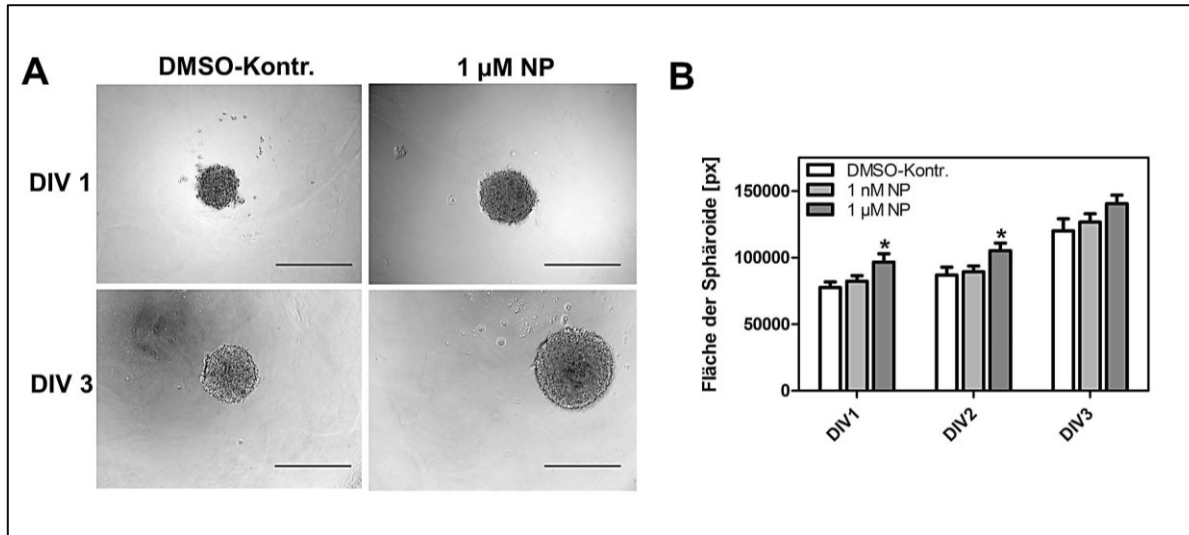


Abbildung 14: Der Einfluss von NP auf die Bildung von Sphäroiden bei B35-Zellen

B35-Zellen wurden in 1 % Agarose-beschichtete 24-Well Platten gegeben und in Anwesenheit von 1 nM bzw. 1 μM NP oder DMSO als Kontrolle für drei Tage inkubiert. (A) Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahme der Sphäroide an Tag eins und drei. Größenunterschiede zwischen NP und Kontrolle sind deutlich sichtbar. Maßstabsbalken 500 μm . (B) Quantitative Auswertung der Sphäroidgrößen zeigen signifikante Unterschiede an den ersten beiden Tagen für die höchste NP-Konzentration auf. Die Fläche in Pixel ist als Mittelwert \pm SEM angegeben und errechnet sich aus den Werten dreier unabhängiger Experimente. * $p < 0,05$. DIV – days *in vitro*; DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol.

Die Flächenwerte in px belaufen sich auf 86.786 ± 5.999 , 89.280 ± 4.427 bzw. 10.5178 ± 5.687 (DMSO; 1; 1000 nM NP). Die statistische Signifikanz hebt sich nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wieder auf. Da der EdU-Assay keine verstärkte Proliferation der B35-Zellen unter dem Einfluss auf NP aufgezeigt hat, kann der Einfluss von NP auf die Größe der Sphäroide auf verringerten Zell-Zell-Kontakt zurückgeführt werden, so dass die Zellcluster weniger kompakt sind.

Sphäroide gleicher Größe wurden anschließend in 0,002 % PLL-beschichtete 12-Well Platten umgesetzt und das Auswachsen der B35-Zellen aus den Sphäroiden beobachtet (Abbildung 15A). Die Timelapse-Aufnahme wurde beendet, sobald die Zellen den Rand des Bildausschnitts erreicht hatten; dies war nach ca. neun Stunden der Fall. Die Auswertung über die Zeit ergab, dass Zellen der DMSO- bzw. NP-Bedingungen alle mit einer ähnlichen großen Fläche adhärenter Zellen starten, sich dann jedoch die Migration unbehandelter Zellen beschleunigt, bis sie sich nach neun Stunden signifikant von der höchsten NP-Konzentration unterscheidet (Abbildung 15B). Die Fläche in px liegt bei der DMSO-Kontrolle nach neun Stunden bei 472.517 ± 12.487 , bei 1 nM NP bei 409.573 ± 16.885 und bei 1 μ M NP bei 349.053 ± 40.121 . Dies bedeutet eine Reduktion der Migration bei NP-behandelten B35-Zellen auf $86,68 \% \pm 3,57 \%$ bzw. $73,87 \% \pm 8,49 \%$ (1; 1000 nM NP). Die verringerten Wanderungseigenschaften sind bei der höchsten NP-Konzentration von 1 μ M mit einem p-Wert von 0,01 statistisch signifikant. Die Migration von B35-Zellen aus den Sphäroiden heraus zeigt also ein gegenteiliges Ergebnis der Wanderungseigenschaften im Scratch-Assay, bei dem NP ein erhöhtes Migrationsverhalten der Zellen hervorriefen.

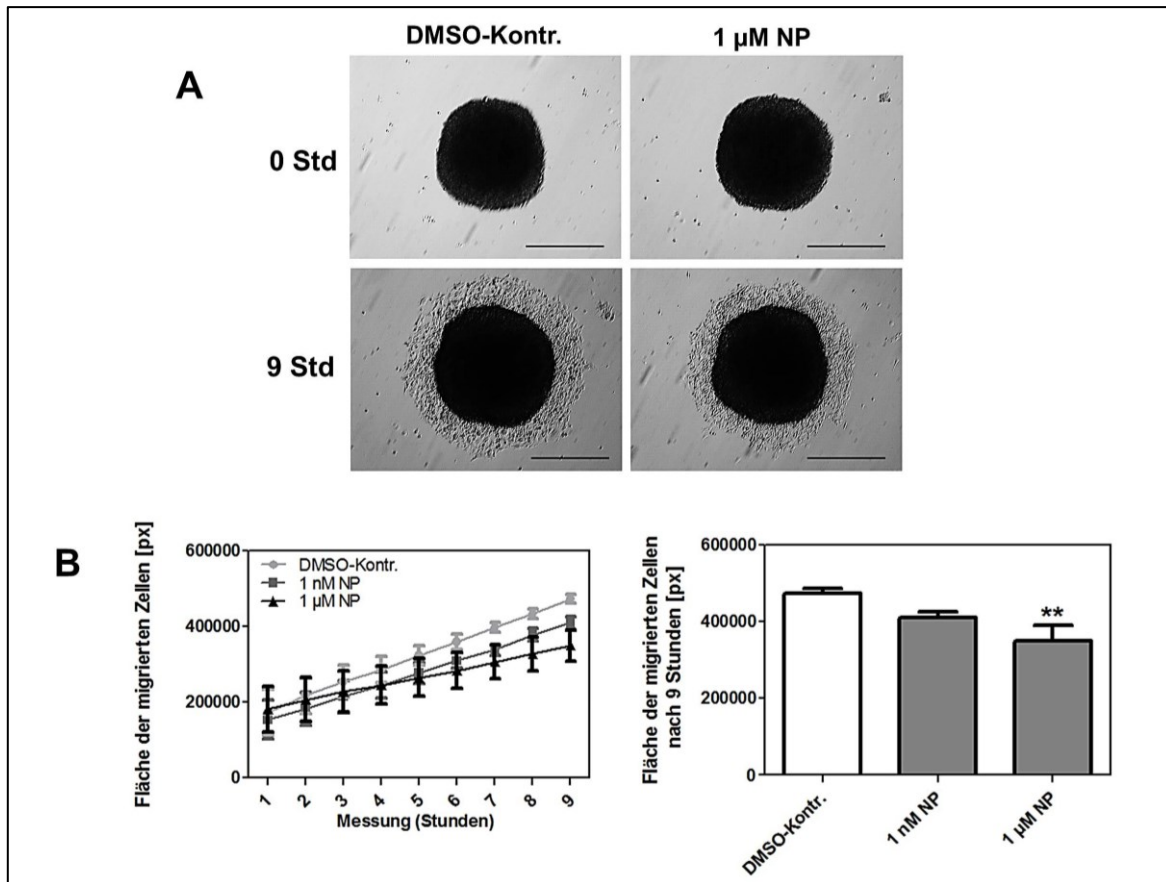


Abbildung 15: Der Einfluss von NP auf die Wanderung von B35-Zellen aus Sphäroiden

Drei Tage alte Sphäroide wurden in 0,002 % PLL-beschichtete 12-Well Platten umgesetzt und in An- oder Abwesenheit von NP die Wanderung der B35-Zellen für neun Stunden via Timelapse-Mikroskopie überwacht. **(A)** Repräsentative Aufnahmen der B35-Zellen zum Beginn der Messung und nach neun Stunden unter dem Einfluss von DMSO als Kontrolle bzw. 1 µM NP. Maßstabsbalken 500 µm. **(B)** Quantitative Auswertung der Migration im Zeitverlauf (links) und nach neun Stunden (rechts). Die Fläche der migrierten Zellen in Pixeln ist als Mittelwert ± SEM angegeben und errechnet sich aus den Werten dreier unabhängiger Experimente. Nach neun Stunden ist der Unterschied der höchsten NP-Konzentration zur DMSO-Kontrolle signifikant. ** $p < 0,01$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol; Std – Stunden

5.5 Der Einfluss von NP auf die cytoskelettale Reorganisation

Die Migrations- und Adhäsionsversuche (siehe 5.4) haben gezeigt, dass NP die Wanderungseigenschaften, den Zell-Zell Kontakt und die Bindung von B35-Zellen an die Zellkulturplatten in verschiedenen Assays ändern. Auch die Bestimmung der Neuritenlängen offenbarte, dass es einen Einfluss von NP auf die dynamische Organisation des Cytoskeletts geben könnte, welches an einer veränderten Reorganisation von Aktin- und Tubulin-Filamenten sichtbar gemacht werden müsste. Neurotoxische Effekte, veränderte Integrität in Zellverbindungen oder eine veränderte Regulation von Zelladhäsionsmolekülen würden sich in unterschiedlicher Anzahl oder Länge von cytoskelettalen Filamenten niederschlagen, welche in der vorliegenden Arbeit über das Programm FilaQuant analysiert wurden.

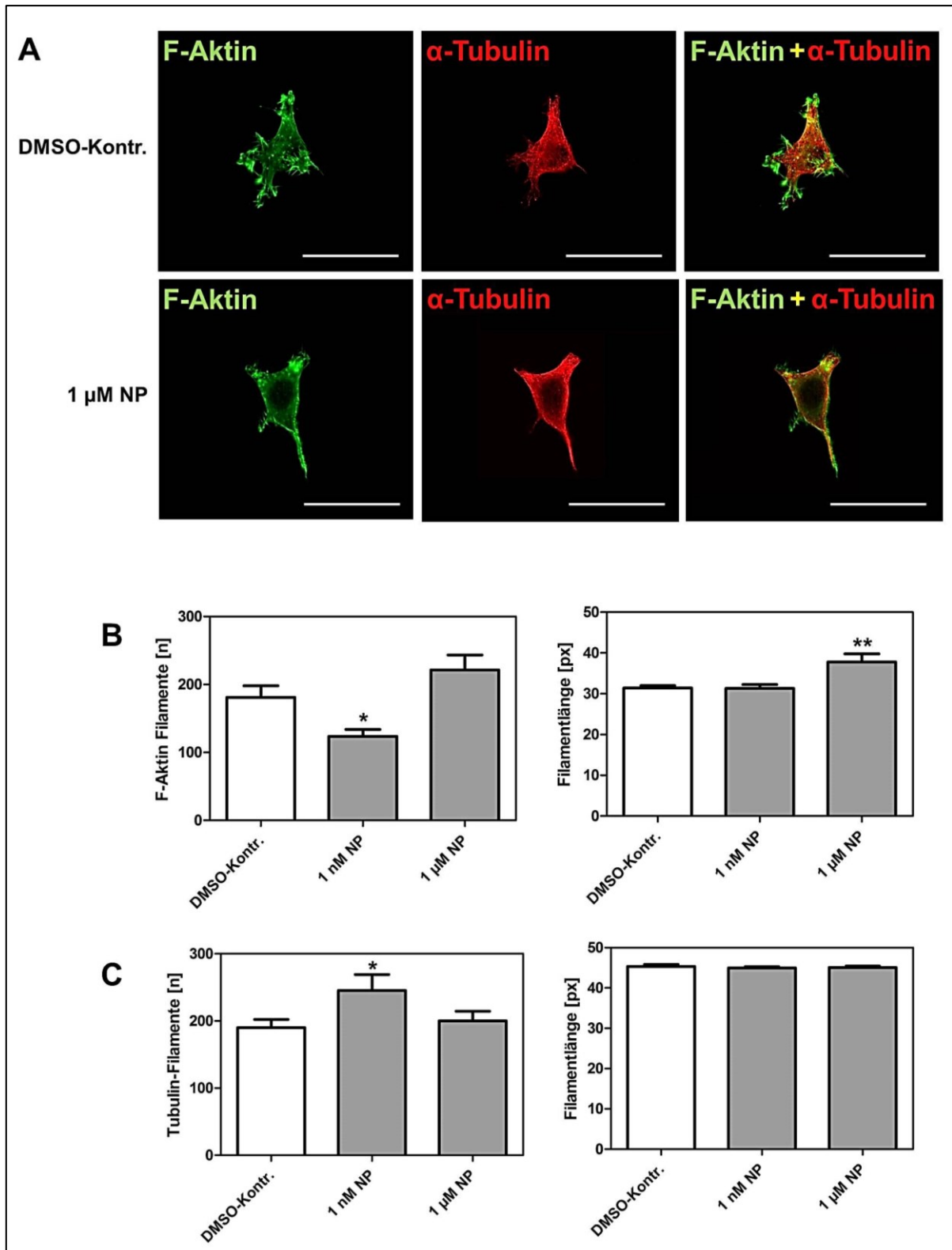


Abbildung 16: Der Einfluss von NP auf die cytokelettale Reorganisation von B35-Zellen

B35-Zellen wurden für drei Tage mit DMSO als Kontrolle oder 1 nM bzw. 1 µM NP behandelt und anschließend die Länge und Anzahl der Filamente ausgewertet. (A) Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen der Organisation von F-Aktin, gefärbt mit Phalloidin (grün) und Mikrotubuli, sichtbar gemacht mit anti α -Tubulin Antikörpern (rot). Maßstabsbalken 100 µm. Quantitative Analyse von Filamentanzahl und -länge von F-Aktin (B) und Tubulin (C) mithilfe der FilaQuant Software. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Hierfür wurden B35-Zellen für drei Tage mit DMSO als Kontrolle bzw. 1 nM oder 1 μ M NP behandelt und anschließend immunfluoreszenzmikroskopisch auf die Länge und Anzahl der F-Aktin und α -Tubulin-Filamente hin untersucht. Wie in Abbildung 16 dargestellt, sorgte die Inkubation der Zellen mit NP sowohl für eine Veränderung der Filamentanzahl, als auch -länge. Die statistische Untersuchung zeigte signifikant weniger Aktin-Filamente bei Zellen auf, welche mit einer geringen NP-Konzentration von 1 nM behandelt wurden (Abbildung 16B). Die durchschnittliche Anzahl wurde hier von $181,10 \pm 16,91$ bei der Kontrolle und auf $123,60 \pm 10,18$ bei der NP-Behandlung reduziert, welches eine Verringerung um $31,75 \% \pm 5,62 \%$ bedeutet. Die Anzahl von Aktin-Filamenten bei 1 μ M NP lag bei $221,5 \pm 21,91$, was im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht erhöht, jedoch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation der Zellen mit 1 nM NP zu einer steigenden Anzahl von Tubulin-Filamenten (Abbildung 16C). Die durchschnittliche Anzahl der Tubulin-Filamente der Kontrolle ($190,20 \pm 11,84$) wurde bei 1 nM mit einer Erhöhung um $29,02 \% \pm 12,46 \%$ auf eine durchschnittliche Filamentanzahl von $245,40 \pm 23,70$ angehoben. Die höhere NP-Konzentration von 1 μ M führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner Veränderung der Filamentanzahl ($200,20 \pm 14,16$). Bezüglich der Filamentlängen konnte gezeigt werden, dass 1 nM NP weder bei Aktin noch Tubulin zu einer signifikanten Veränderung führte. Die Filamentlängen für Aktin beliefen sich auf $31,30 \pm 0,60$, $31,40 \pm 0,94$ bzw. $37,79 \pm 2,00$ (DMSO; 1; 1000 nM NP). Dies entsprach einer signifikanten Verlängerung der Filamente um $20,35 \% \pm 6,36 \%$ bei der hohen NP-Konzentration von 1 μ M. Bezüglich der Mikrotubuli ergaben sich Filamentlängen von $45,36 \pm 0,49$, $44,96 \pm 0,30$ bzw. $45,05 \pm 0,40$ (DMSO; 1; 1000 nM NP), die sich jedoch statistisch nicht voneinander unterschieden. Zusammenfassend konnte also gesagt werden, dass der Einsatz von geringen Konzentrationen NP zu einer verringerten Anzahl von Aktin-Filamenten, im Gegensatz dazu aber zu einer erhöhten Anzahl von Tubulin-Filamenten führt. Die geringe Konzentration hatte wiederum keinen Einfluss auf die Länge von Aktin- und Tubulinfasern, jedoch führte eine hohe NP-Konzentration zu einer größeren Länge von Aktin-Filamenten.

5.6 Der Einfluss von NP auf den ERK1/2-Signalweg

Die ERK1/2-Kinase des MAP-Kinase Signalweges hat Einfluss auf die Differenzierung von Zellen, welche konsequenterweise zur Ausbildung eines reiferen Phänotyps mit dem Auswachsen von Neuriten in B35-Zellen einhergeht. Die ERK-Kinase ist dabei in ihrem phosphorylierten Zustand in der Lage, stromabwärts liegende Phosphorylierungskaskaden anzuschleichen. Zunächst sollte überprüft werden, ob die längere Inkubation von differenzierten und undifferenzierten B35-Zellen zu einer Änderung der konstitutiven ERK-Expression führt. Dazu wurden die Zellen für 72 Stunden mit DMSO als Kontrolle oder 100 nM bzw. 1 μ M NP behandelt und anschließend mittels Westernblot die Menge an ERK quantifiziert. Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle. Die Abbildung 17 zeigt, dass eine vorangegangene Differenzierung der B35-Zellen dazu führt, dass sich die basale ERK-Expression verändert.

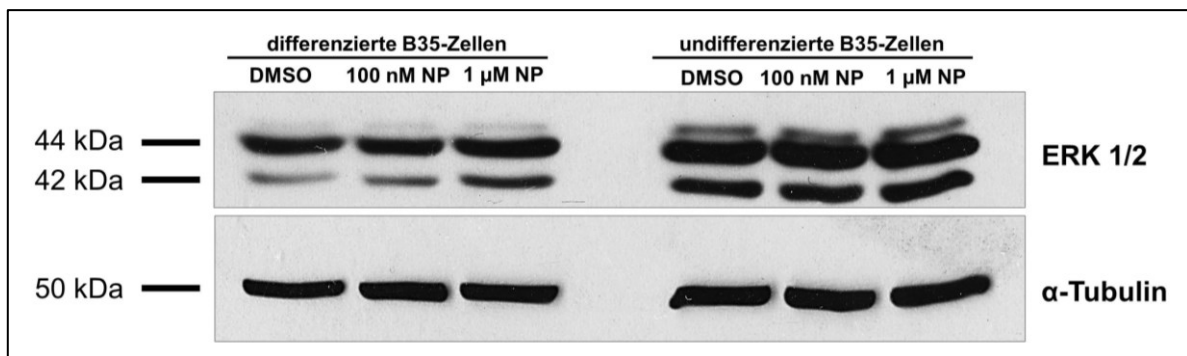


Abbildung 17: Der Einfluss einer Langzeitexposition mit NP auf die konstitutive ERK1/2-Expression in B35-Zellen

Differenzierte und undifferenzierte B35-Zellen wurden für 72 Stunden mit DMSO als Kontrolle oder 1 nM bzw. 1 μ M NP behandelt. 30 μ g Protein wurden auf ein SDS-Gel geladen und anschließend zum Westernblot überführt. Nach Antikörper-Behandlung mit anti-ERK1/2 wurde die Membran gestriped und als Ladekontrolle mit anti- α -Tubulin Antikörpern behandelt. Die Differenzierung von B35-Zellen führt zu einer Änderung der konstitutiven ERK-Expression. Die dritte Bande bei 46 kDa könnte von einem alternativen Spleiß-Produkt von ERK1 (ERK1b) in Ratten herrühren (Yung *et al.*, 2000). DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Versuchen nur noch mit undifferenzierten Zellen gearbeitet, um den Einfluss von NP auf die ERK-Aktivität im phosphorylierten Zustand nicht durch eine veränderte Gesamt-ERK-Expression zu überlagern. NP in unterschiedlichen Konzentrationen hatten nach einer Langzeitinkubation hingegen keinen Einfluss auf die konstitutive ERK-Expression von undifferenzierten B35-Zellen. Da die Phosphorylierung von ERK jedoch eine kurzfristige Regulation ist, wurden in den Versuchen zur Ermittlung der ERK-Aktivität im Weiteren nur kurze Expositionszeiten mit NP von maximal 30 Minuten betrachtet. Somit wurde anschließend zunächst der Einfluss von 100 nM

NP auf die Aktivität der ERK-Kinasen bestimmt. Dazu wurden die Zellen für 10, 20 oder 30 Minuten mit 100 nM NP behandelt, direkt lysiert und im Westernblot die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 analysiert. Die Quantifizierung der Blots zeigte keinen signifikanten Unterschied im ERK1/2-Phosphorylierungsstatus von NP-behandelten Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen auf (Abbildung 18B). Somit war die Aktivität von ERK1/2 durch NP weder verringert, noch erhöht. Es ist anzumerken, dass die interindividuellen Unterschiede zwischen den Blots sehr hoch waren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass NP bei einer Konzentration von 100 nM keinen Einfluss auf die Aktivität der ERK-Kinase ausübt und Unterschiede zwischen Kontrollen und NP-Behandlungen zufälliger Natur waren.

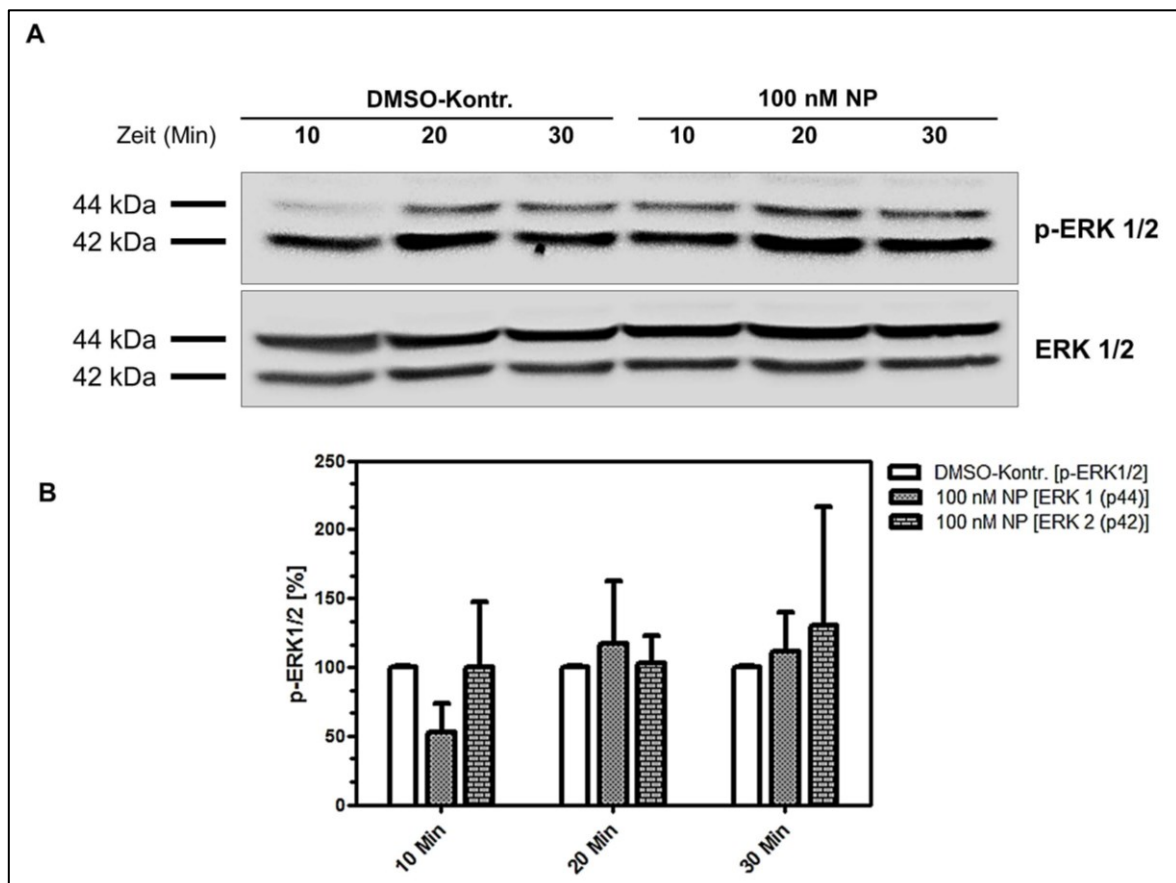


Abbildung 18: Der Einfluss einer Exposition mit 100 nM NP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in B35-Zellen

Undifferenzierte Zellen wurden mit 100 nM NP oder der entsprechenden Kontrolle für 10, 20 oder 30 Minuten behandelt und anschließend lysiert. **(A)** Repräsentative Aufnahme eines Westernblots. 30 µg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel geladen und anschließend dem Westernblot überführt. Nach Entfernung der p-ERK Antikörper wurde die Expression der Gesamt-ERK-Expression bestimmt. **(B)** Quantifizierung der ERK-Expression nach 10, 20 bzw. 30 Minuten Inkubation von B35-Zellen mit 100 nM NP. Die p-ERK1/2 Banden wurden gegen die ERK1/2-Gesamtexpression normalisiert. Die Phosphorylierung der DMSO-Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Um zu überprüfen, ob eine höhere Konzentration von NP in der Lage ist, die Phosphorylierung von ERK1/2 positiv oder negativ zu regulieren, wurde der Versuch mit 1 μM NP wiederholt. B35-Zellen wurden wiederum für 10, 20 oder 30 Minuten mit NP behandelt und die Phosphorylierung von ERK1/2 auf die konstitutive ERK-Expression normalisiert. Abbildung 19A zeigt einen repräsentativen Westernblot, Abbildung 19B die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Es ist deutlich zu erkennen, dass 1 μM NP die Phosphorylierung und damit die Aktivität von ERK1/2 zeitabhängig inhibiert.

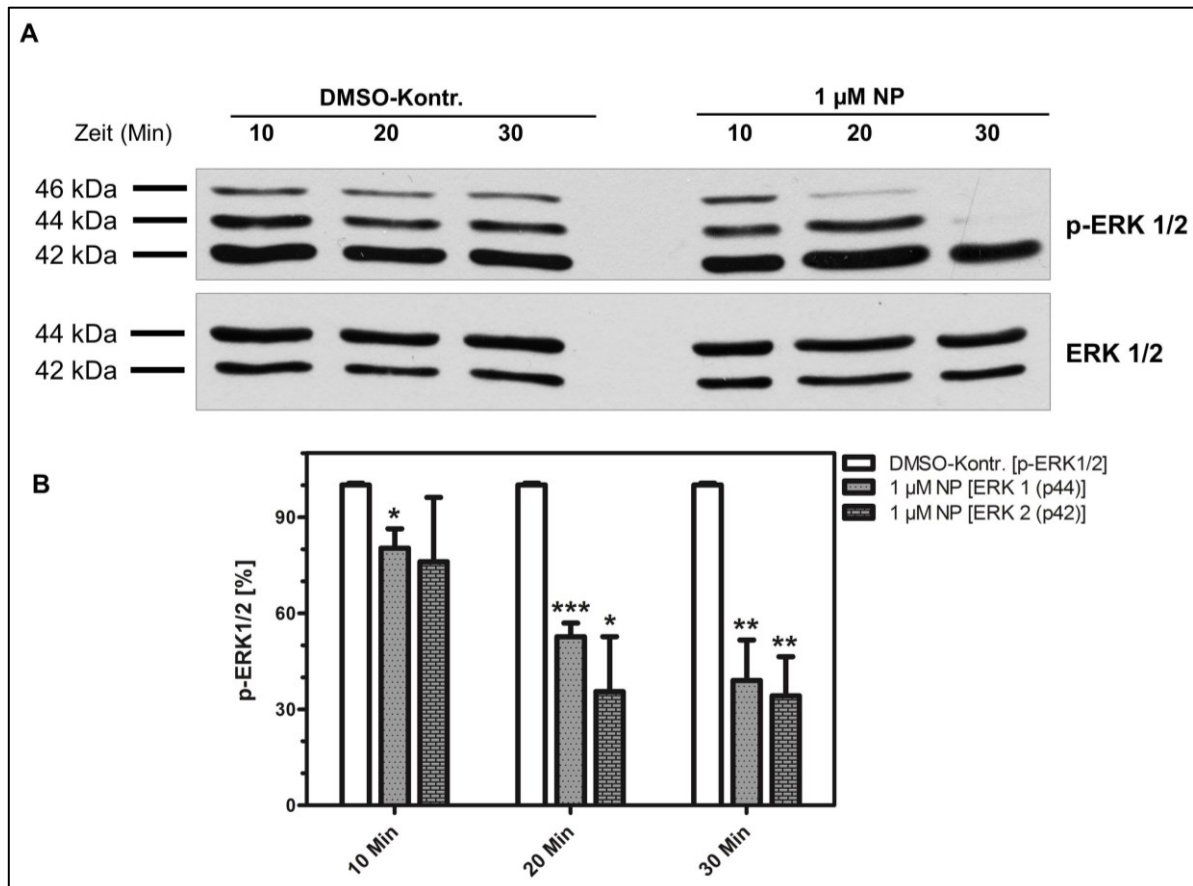


Abbildung 19: Der Einfluss einer Exposition mit 1 μM NP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in B35-Zellen

Undifferenzierte Zellen wurden mit 1 μM NP oder der entsprechenden Kontrolle für 10, 20 oder 30 Minuten behandelt und anschließend lysiert. **(A)** Repräsentative Aufnahme eines Westernblots. 30 μg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel geladen und anschließend zum Westernblot überführt. Nach Entfernung des p-ERK Antikörpers wurde die Expression der Gesamt-ERK-Expression bestimmt. Die dritte Bande bei 46 kDa könnte von einem alternativen Spleiß-Produkt der ERK1 (ERK1b) in Ratten herrühren (Yung *et al.*, 2000). **(B)** Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. P-ERK1/2 Signale wurden gegen Gesamt-ERK1/2 normalisiert und die DMSO-Kontrolle gleich 100 % gesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Die Phosphorylierung sank kontinuierlich von $100 \% \pm 1,0 \%$ (DMSO-Kontrolle) auf $34,2 \% \pm 12,2 \%$ ($1 \mu\text{M}$ NP, 30 Minuten) bei der ERK 1 und auf $39,0 \% \pm 12,7 \%$ ($1 \mu\text{M}$ NP, 30 Minuten) bei der ERK 2. Der Effekt von NP auf die Aktivität der ERK-Kinase war bereits nach 10 Minuten für die ERK1 signifikant, dieser verstärkte sich im zeitlichen Verlauf noch weiter. Da zuvor keine Auswirkungen auf die konstitutive ERK-Expression ermittelt wurde (siehe Abbildung 17), kann von einem exklusiven Effekt von NP auf die Aktivität von ERK1/2 und nicht auf die Expression im Allgemeinen ausgegangen werden.

5.7 Der Einfluss von NP auf die synaptische Plastizität von Primärneuronen

Ein durchschnittliches Neuron bildet rund 1000 synaptische Kontakte aus und empfängt bis zu 10.000 Kontakte. Im Gegensatz zu elektrischen können chemische Synapsen sowohl hemmende, als auch erregende Vorgänge steuern. Sie sind flexibler und rufen im Allgemeinen komplexere Verhaltensreaktionen hervor. Das Protein Synaptophysin hat mehrere α -Helices, die in der Vesikelmembran von Synapsen verankert sind und vermutlich einen Kanal bilden (Kandel, 2011). Es kann als Marker für die Anzahl synaptischer Verbindungen herangezogen werden. Primäre Neuronen aus dem Kleinhirn von P3/4 Wildtypmäusen wurden isoliert und für 11 Tage mit 10 nM oder $1 \mu\text{M}$ NP bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenz mit Synaptophysin-Antikörpern und Quantifizierung der synaptischen Vesikel. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengefasst. Die quantitative Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied in der Anzahl Synaptophysin-positiver Vesikel zwischen behandelten und unbehandelten Kleinhirnneuronen. Die Inkubation mit NP führte hierbei zu einer starken Reduzierung der Vesikel mit einer Reduktion um $40,12 \% \pm 6,73 \%$ für 10 nM NP und $55,67 \% \pm 8,58 \%$ für $1 \mu\text{M}$ NP. Die durchschnittliche synaptische Dichte lag demnach bei DMSO-behandelten Neuronen bei $44,39 \pm 3,11$ Punkten pro μm und bei NP-behandelten Zellen nur bei $26,58 \pm 2,99$ bzw. $19,68 \pm 3,81$ Punkten pro μm (10; 1000 nM NP). Der Unterschied ist mit einem p-Wert von $< 0,05$ bzw. $< 0,01$ dabei hoch signifikant. Im Gegensatz dazu ist die Intensität der fluoreszierenden Vesikel unter dem Einfluss von NP nicht statistisch unterschiedlich, obschon auch hier eine starke Tendenz in Richtung schwächerer Intensität bei NP-behandelten Zellen sichtbar ist. Die Intensität liegt bei der DMSO-Kontrolle bei $1.290 \text{ px} \pm 231 \text{ px}$; bei 10 nM NP bei $1.064 \text{ px} \pm 194 \text{ px}$ und bei der höchsten NP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ bei $683 \text{ px} \pm 135 \text{ px}$. Es kann zusammenfassend konstatiert werden, dass eine 11-tägige Behandlung von cerebellaren Primärneuronen in Zellkultur mit NP zu einer Abnahme synaptischer Vesikel und einer Verringerung von Synaptophysin in der Vesikelmembran führt.

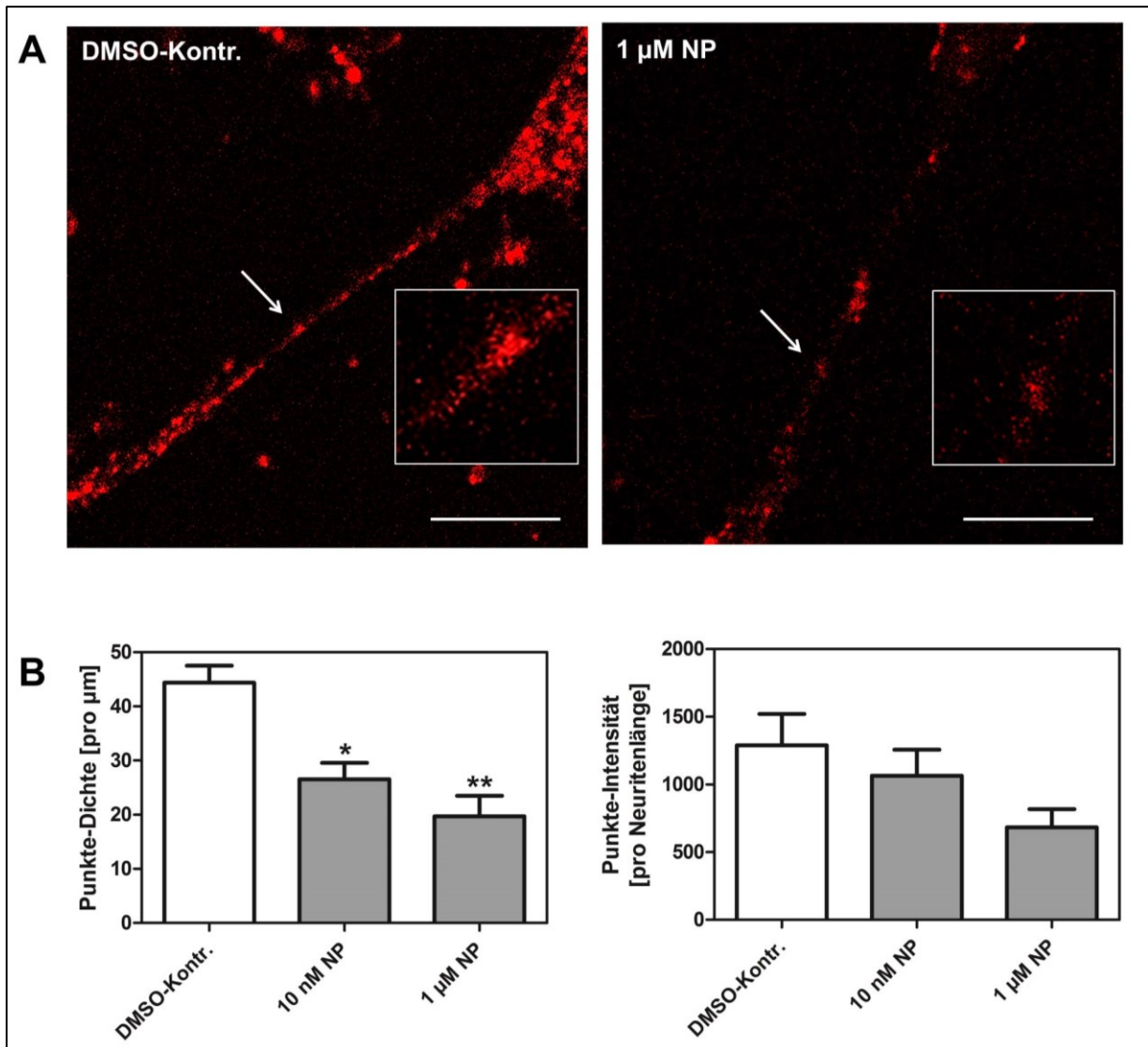


Abbildung 20: Der Einfluss von NP auf die Ausbildung von Synapsen in Kleinhirnneuronen

Cerebellare Neuronen wurden aus P3/4-Mäusen isoliert, mit 10 nM oder 1 µM NP bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und nach 11 Tagen in einer Immunfluoreszenz mit Synaptophysin-Antikörpern die Punkte-Dichte und -Intensität der synaptischen Verbindungen quantifiziert. **(A)** Repräsentative Konfokalaufnahme von zwei sich berührenden Kleinhirnneuronen. Jeder Punkt (CyTM3-markiertes Synaptophysin) symbolisiert eine Synapse. Maßstabsbalken 100 µm. **(B)** Quantitative Auswertung der Anzahl von Synaptophysin-Vesikeln pro µm Neuron (links) und der Fluoreszenz-Intensität pro Neuritenlänge (rechts) mithilfe der Software SynPAnal. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. *p < 0,05; **p < 0,01. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

5.8 Der Einfluss von NP auf die Zebrafisch-Entwicklung

Um biologische Eigenschaften von chemischen Substanzen zu adressieren, wird häufig der Zebrafisch als Modellorganismus herangezogen. Untersucht wurden in vorliegender Arbeit morphologische Malformationen, Änderungen in der Reifung bzw. Wanderung von OPCs sowie apoptotische und proliferative Veränderungen im ZNS von Zebrafischen.

5.8.1 Der Einfluss von NP auf die morphologische Entwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zebrafische wenige Stunden nach der Befruchtung zum ersten Mal mit NP in Kontakt gebracht. Die Behandlung über drei Tage erfolgte mit einer niedrigen (1 nM) und einer hohen Dosis (1 μ M) NP oder DMSO als Kontrolle. Die Beurteilung ihrer Morphologie wurde am Lichtmikroskop durchgeführt. Durch den Farbstoff Methyleneblau, welcher an 1 dpf als sterilisierender Zusatz im Danieau-Medium zugegeben ist, kann gut zwischen befruchteten und unbefruchteten Eiern bzw. toten Fischen unterschieden werden. Die Eier haben dann eine milchige Farbe und sind opak. Der Anteil von toten Fischen lag bei unbehandelten und behandelten Fischen in etwa bei 5-10 %, was einer physiologischen Sterberate entspricht (Daten nicht gezeigt). Nach zwei Tagen Inkubation mit NP konnte jedoch beobachtet werden, dass Fische der höchsten Konzentration noch nicht aus ihrem Ei geschlüpft waren und teilweise auch nach drei Tagen nicht in der Lage waren, die Ei-Hülle zu durchbrechen, so dass der Vorgang enzymatisch unterstützt werden musste (Abbildung 21). An 3 dpf zeigten Zebrafische, welche mit 1 μ M NP behandelt wurden, einen starken Phänotyp. Sie wiesen eine ventral gebogene Körperachse auf, wodurch sie kein normales Schwimmverhalten ausprägten, sondern sich lediglich im Kreis drehten. Der Anteil von Fischen mit diesem deutlichen Phänotyp lag zwischen 50 und 70 %, so dass die hohe NP-Konzentration als toxisch eingestuft wurde. Es könnte zu verstärkter Apoptose oder Proliferation in dorsalen oder ventralen Regionen gekommen sein. Für die weiteren Versuche war es jedoch essentiell, dass die Fische planar waren. Aus diesem Grund wurde die Konzentration halbiert und mit 500 nM NP als höchster Konzentration weiter gearbeitet.

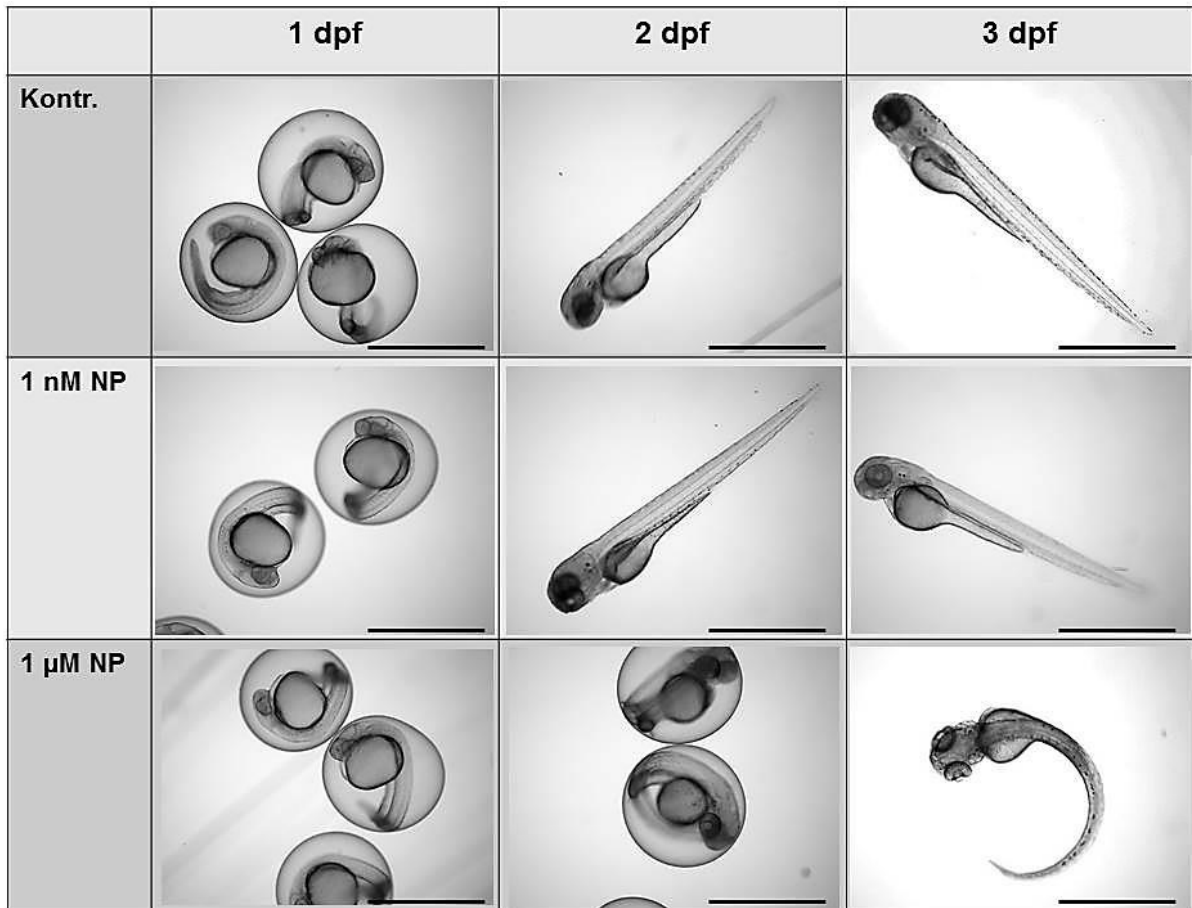


Abbildung 21: Der Einfluss von NP auf die morphologische Entwicklung von Zebrafischen

Zebrafische wurden für drei Tage mit DMSO als Kontrolle bzw. 1 nM oder 1 µM NP behandelt und ihre Entwicklung unter dem Stereomikroskop dokumentiert. Nach zwei Tagen schlüpfen die Fische normalerweise aus dem Ei, was jedoch bei der NP-Konzentration von 1 µM nicht der Fall war. Dies deutet auf eine verzögerte Entwicklung hin. Nach drei Tagen wiesen diese Fische einen Phänotyp auf, der ihr Schwimmverhalten beeinträchtigte. Die Fische waren ventral um ihre Körperachse gebogen, was auf toxische Effekte von NP in diesen hohen Konzentrationen hindeuten könnte. Maßstabsbalken 1 mm. Dpf – days post fertilization; Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

5.8.2 Der Einfluss von NP auf die Migration von OPCs

Da Zebrafische in ihrer Hautpigmentierung gehemmt werden können, sind Forscher mithilfe von Reporterfischlinien in der Lage, die Entwicklung bestimmter Neuronengruppen zu untersuchen, indem durch die Fische hindurch mikroskopiert wird. Die Wanderung von OPCs wurde zunächst am 2-Photonenmikroskop analysiert und anschließend mit der automatischen Auswertung am EnSight verglichen. In beiden Fällen wurden die Zebrafische für vier Tage mit 150, 250 oder 500 nM NP bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. An 4 dpf erfolgte die Einbettung in Agarose für die Analyse am 2-Photonenmikroskop. Hier wurde ein immer gleicher Ausschnitt gewählt, in dem alle dorsal migrierten Olig2-positiven OPCs manuell ausgezählt wurden. Abbildung 22A zeigt eine exemplarische Aufnahme des 2-Photonen-

Mikroskops, bei der das Rückenmark und alle auswandernden Neuronenvorläuferzellen mit ihrer typischen Morphologie erkennbar sind. Hierbei zeigte sich, dass es, bezogen auf den Durchmesser von Zellober- zu Zellunterseite, eher runde und eher flache Zellen gibt, jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei den flachen Zellen um differenziertere Zellen handelt, so dass aufgrund der Morphologie keine Interpretationen möglich sind. Die Auswertungen, bei denen Fische in eine 96-Well Platte umgesetzt und im Hochdurchsatz im EnSight Gerät analysiert wurden, erfolgten parallel. Nach manuellem Auszählen von jeweils drei unabhängigen Experimenten im 2-Photonenmikroskop und automatischer Auswertung im EnSight ergab sich, dass die tendenziellen Unterschiede in der Anzahl dorsaler Olig2-positiver Zellen bei 2-Photonenmikroskop und EnSight konvergierten. Lediglich die absolute Anzahl der Zellen unterschied sich, da beim 2-Photonenmikroskop im Gegensatz zum EnSight nur ein kleiner Ausschnitt des Rückenmarks untersucht wurde, wohingegen bei der automatischen Auswertung alle dorsal migrierten Zellen des Rückenmarks ausgezählt wurden. Abbildung 22B zeigt die quantitative Auswertung von dorsal migrierten Olig2-positiven OPCs der EnSight Analyse, Daten der manuellen Auszählung sind nicht dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass unter dem Einfluss von NP die Anzahl Dosis-abhängig ansteigt. Dieser Effekt ist ab einer NP-Konzentration von 500 nM statistisch signifikant (*p < 0,05). Bei DMSO-behandelten Fischen wanderten durchschnittlich $48,11 \pm 1,72$ Zellen, bei den NP-behandelten Fischen waren es $51,66 \pm 2,79$, $54,85 \pm 2,06$ und $56,03 \pm 1,52$ Zellen (150; 250; 500 nM NP). Dies ist eine Erhöhung um $16,46 \% \pm 3,16 \%$ bei der höchsten NP-Konzentration. Ob es sich bei diesem Effekt um einen verstärkte Wanderung oder erhöhte Proliferation der Zellen handelt, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht ableiten.

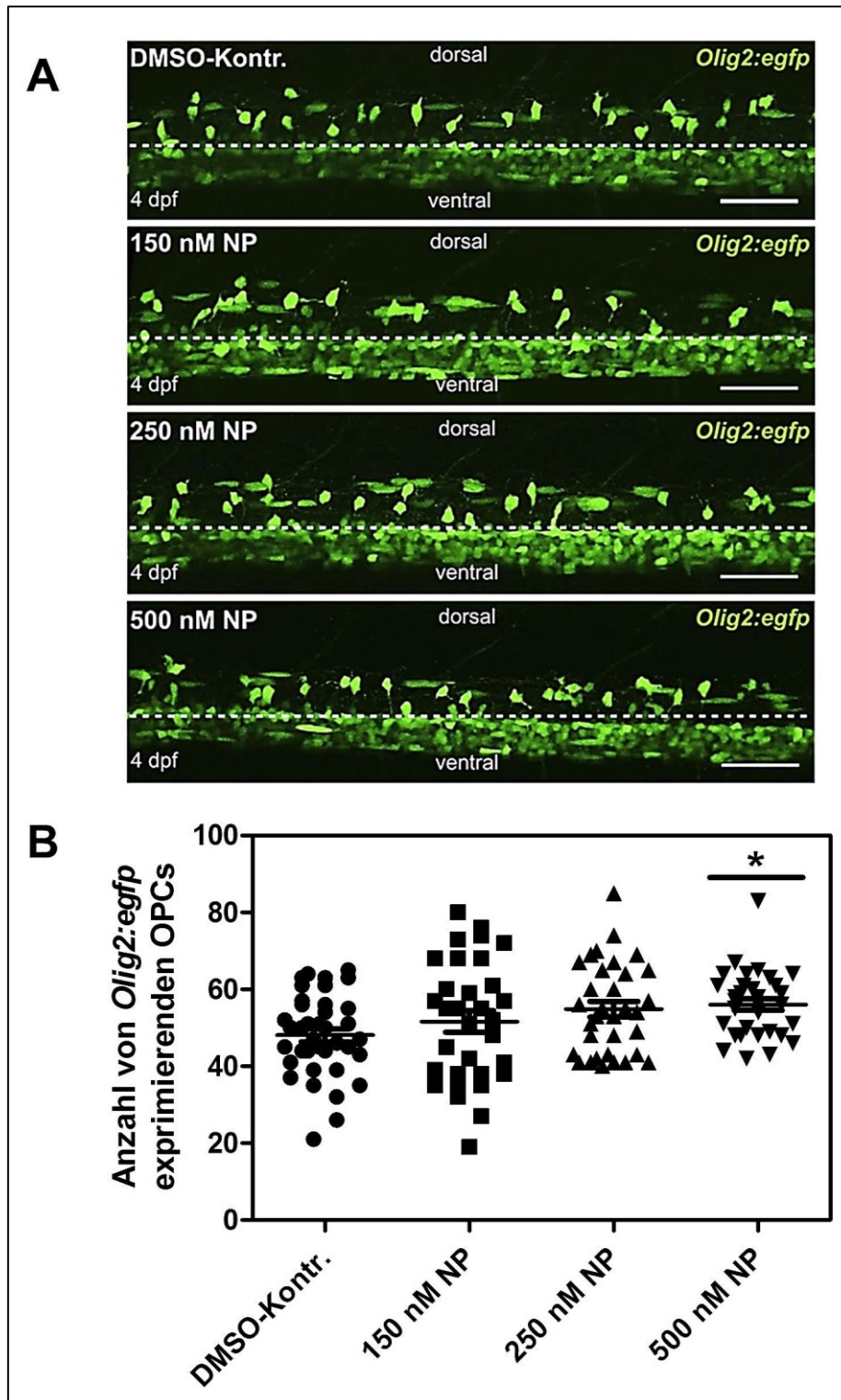


Abbildung 22: Der Einfluss von NP auf dorsale Olig2:egfp exprimierende OPCs im Zebrafisch

Zebrafische wurden für vier Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen NP oder DMSO als Kontrolle behandelt. **(A)** Repräsentative Aufnahmen des ZNS von Zebrafischen, welche am 2-Photonenmikroskop generiert wurden. Zu sehen sind Olig2:egfp exprimierende OPCs, die sich aus der pMN-Region ablösen und in Richtung der Axone migrieren. Maßstabsbalken 50 µm. **(B)** Quantitative Auswertung der Anzahl von Olig2:egfp exprimierenden OPCs, welche durch die automatische Auswertung am EnSight generiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt symbolisiert einen Fisch. * $p < 0,05$. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; dpf – days post fertilization; NP – Nonylphenol; OPCs – Oligodendrocyten-Vorläuferzellen (oligodendrocyte precursor cells)

5.8.3 Der Einfluss von NP auf reife Oligodendrocyten

Da es sich, wie in Versuch 5.8.2 gezeigt, um unreife Oligodendrocyten-Vorläuferzellen handelt und keine Rückschlüsse darüber möglich sind, ob diese am Ende auch die Axone myelinisieren, so dass eine funktionelle Aussage möglich wäre, wurde mithilfe eines zweiten Markers für reife Oligodendrocyten überprüft, ob ein Effekt von NP auch noch bei reifem Phänotyp ausgeprägt ist. CldnK wird spezifisch von Zellen exprimiert, die Myelin während der Entwicklung des Nervensystems beim Fisch generieren. Der experimentelle Aufbau war genauso wie bei Versuch 4.3.3, Fische wurden für vier Tage mit 150, 250 und 500 nM NP bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend im EnSight fotografiert. Für die manuelle Auszählung der CldnK-positiven Zellen wurde jeder einzelne Fisch begutachtet. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, steigt die Anzahl von CldnK-exprimierenden Zellen mit steigender NP-Konzentration an. Dieser Effekt ist bereits ab einer NP-Konzentration von 150 nM statistisch signifikant (* $p < 0,05$). Bei DMSO-behandelten Fischen wanderten durchschnittlich $67,06 \pm 3,02$ Zellen, bei den NP-behandelten Fischen waren es $80,07 \pm 2,83$, $92,16 \pm 3,41$ und $89,88 \pm 4,26$ (150; 250; 500 nM NP).

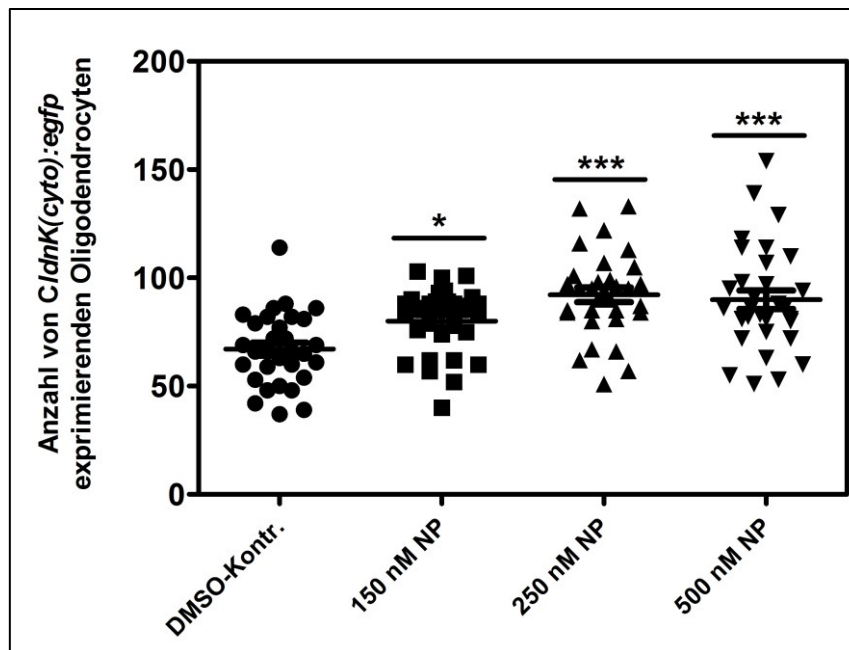


Abbildung 23: Der Einfluss von NP auf dorsale CldnK(cyto):egfp exprimierende Oligodendrocyten im Zebrafisch

Zebrafische wurden für vier Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen NP oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung der Anzahl von CldnK(cyto):egfp exprimierenden Oligodendrocyten, welche manuell ausgezählt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt symbolisiert einen Fisch. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. CldnK – Claudin K; DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Um auszuschließen, dass eine erhöhte Anzahl unreifer und reifer Oligodendrocyten auf ein verändertes Längenwachstum der Fische zurückzuführen ist, wurden zusätzlich die Körpergrößen der Fische über das Programm des EnSight-Gerätes ausgelesen und analysiert. Wie in Abbildung 24C erkennbar ist, wiesen Zebrafische aller Behandlungsarten eine ähnliche Körpergröße auf. Fische der DMSO-Kontrolle wiesen im Mittel eine Länge von $3.731 \mu\text{m} \pm 30,68 \mu\text{m}$ auf, wohingegen sich der Mittelwert der NP-behandelten Fische auf $3.783 \mu\text{m} \pm 36,21 \mu\text{m}$, $3.809 \mu\text{m} \pm 31,92 \mu\text{m}$, bzw. $3.821 \mu\text{m} \pm 27,62 \mu\text{m}$ belief (150; 250; 500 nM NP).

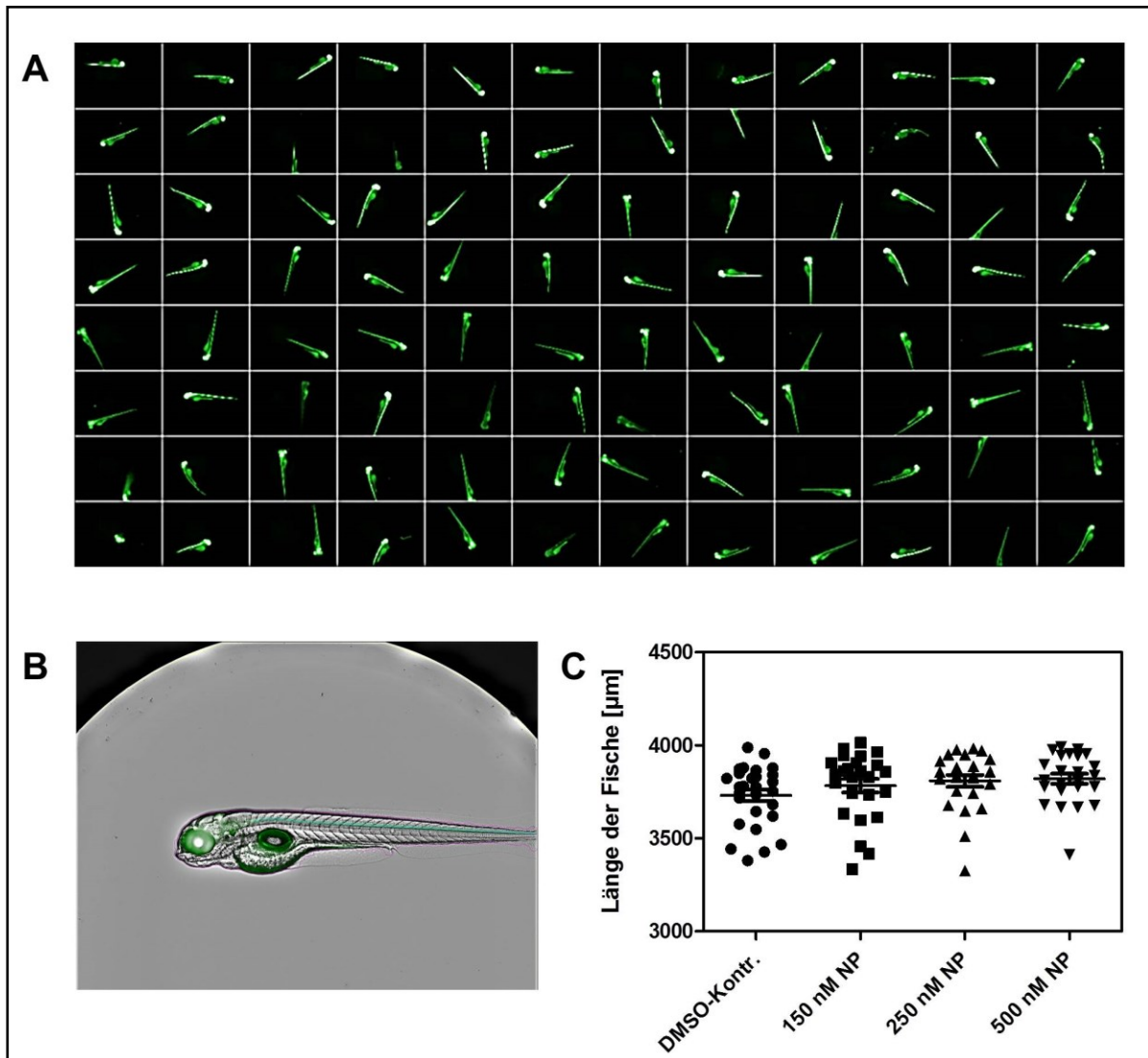


Abbildung 24: 96-Well Platte, Detailaufnahme und Längenverteilung von Zebrafischen der Linie CldnK(cyto):egfp

(A) In jeder Vertiefung befindet sich ein Fisch, welcher im Hochdurchsatz vom EnSight-Gerät fotografiert wird. Für die Auswertung mussten sich die Fische in der Mitte des Wells, auf dem Bauch liegend, befinden. Vergrößerungsmaßstäbe im Programm nicht verfügbar. (B) Automatische Erkennung von Fischmorphologie und Länge der Zebrafische durch das EnSight-Gerät. (C) Die Analyse der Körperlängen der Zebrafische ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen einzelnen Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt symbolisiert einen Fisch. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

5.8.4 Der Einfluss von NP auf Proliferation und Apoptose im ZNS

Nachdem eine erhöhte Anzahl von unreifen OPCs und reifen Oligodendrocyten im Rückenmark von Zebrafischen nach einer viertägigen Behandlung mit unterschiedlichen NP-Konzentrationen in den Versuchen 5.8.2 und 5.8.3 festgestellt wurde, sollte überprüft werden, ob dies auf eine allgemein erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen ist. Die immunohistochemische Färbung erfolgte mithilfe des Markers PCNA. Des Weiteren wurde der Apoptosemarker c-Caspase 3 herangezogen, um Zellsterben im ZNS sichtbar zu machen. Feingewebliche Strukturen der Sagittalschnitte von 4 dpf Zebrafischlarven wurden mit einer HE-Färbung sichtbar gemacht, Immunreaktionen sind in braun erkennbar. Anhand von Abbildung 25 (Proliferation) und Abbildung 26 (Apoptose) ist erkennbar, dass Fische, die mit 500 nM NP behandelt wurden, sowohl eine verstärkte Zellteilungsrate, als auch Apoptoserate im ZNS aufweisen

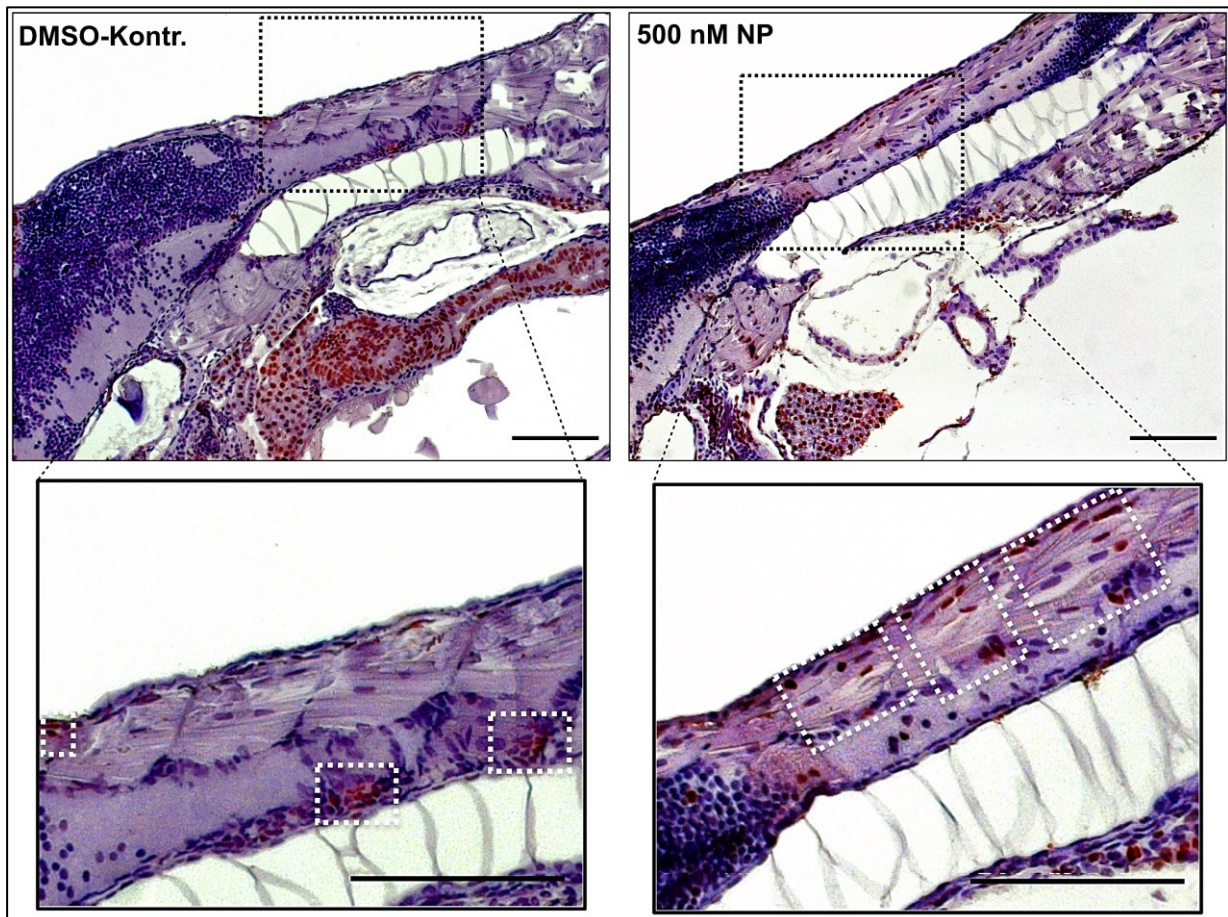


Abbildung 25: Zellproliferation im Rückenmark von Zebrafischen

20 μm dicke Sagittalschnitte von 4 dpf Zebrafischlarven, die mit DMSO als Kontrolle oder 500 nM NP behandelt wurden. HE-Färbung ist violett und Immunreaktion von PCNA-positiven Zellen braun dargestellt. Die oberen Bilder zeigen dabei einen Ausschnitt der Larve, der in der unteren Reihe vergrößert ist und das Rückenmark verdeutlicht. Weiß gestrichelte Kästen symbolisieren Bereiche mit hoher Proliferationsrate. Maßstabsbalken 200 μm . DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

Die Proliferation von Zellen findet bei Fischen, die mit 500 nM NP behandelt wurden, im gesamten Rückenmark statt, wohingegen sie sich bei unbehandelten Fischen auf einige wenige Bereiche konzentriert. Auf der anderen Seite ist die Apoptoserate im ZNS bei behandelten und unbehandelten Fischen sehr gering. Bei Fischen, die mit DMSO behandelt wurden, sind im spezifischen Bereich des Rückenmarks gar keine apoptotischen Zellen zu finden, bei NP-behandelten sind es einige wenige, jedoch muss beachtet werden, dass die Immunfärbung hier insgesamt deutlicher zu sehen ist. Eine verstärkte Zellteilung kann in diesem Fall erklären, warum im ZNS der Zebrafische, die mit NP behandelt wurden, mehr OPCs und reife Oligodendrocyten gefunden wurden. Die Ergebnisse wären somit auf eine erhöhte Proliferation und weniger auf eine verstärkte Migration zurückzuführen. Die Ergebnisse sind jedoch zunächst aufgrund nur einer Wiederholung als vorläufig zu betrachten und können bislang nicht quantifiziert werden.

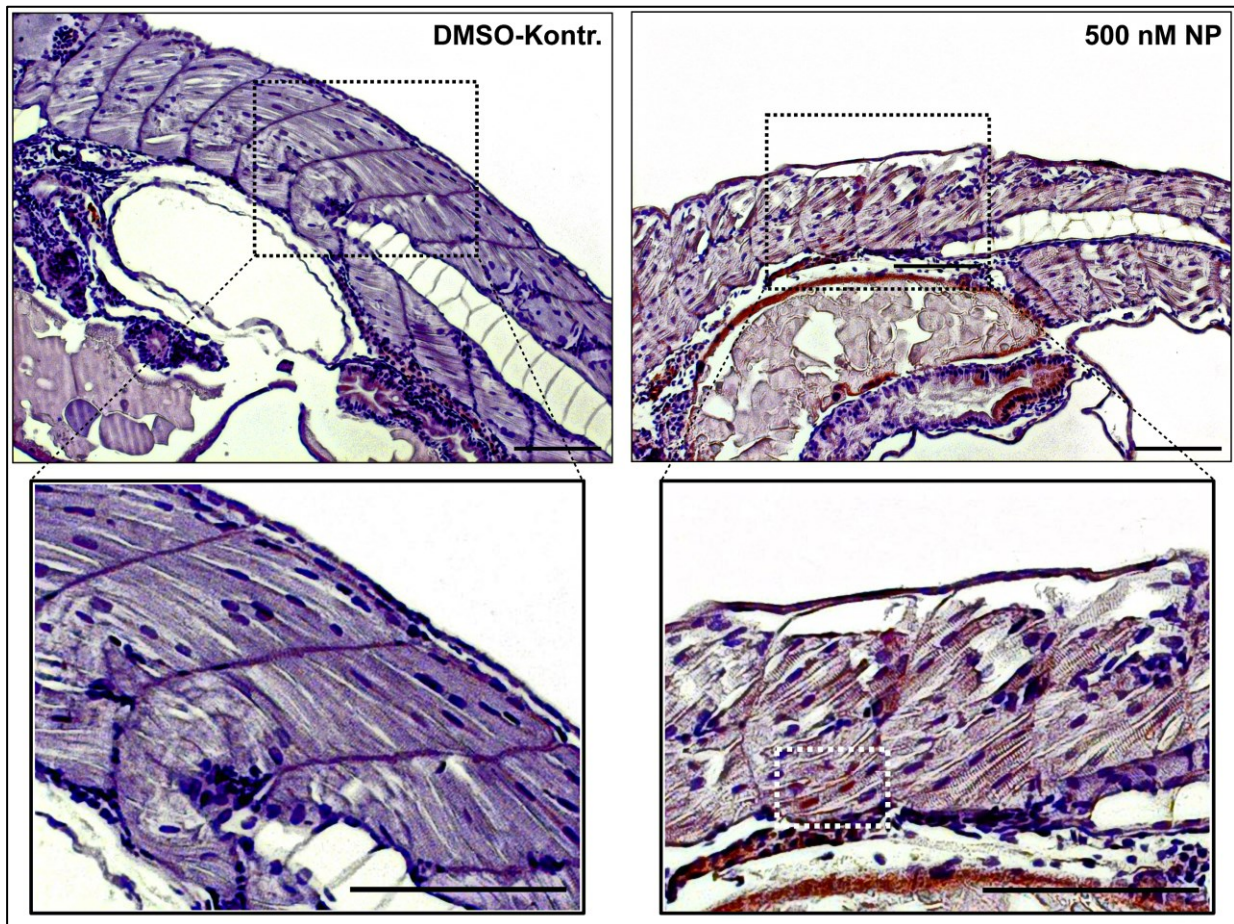


Abbildung 26: Apoptose im Rückenmark von Zebrafischen

20 µm dicke Sagittalschnitte von 4 dpf Zebrafischlarven, die mit DMSO als Kontrolle oder 500 nM NP behandelt wurden. HE-Färbung ist violett und Immunreaktion von c-Caspase 3-positiven Zellen braun dargestellt. Die oberen Bilder zeigen dabei einen Ausschnitt der Larve, der in der unteren Reihe vergrößert ist und das Rückenmark repräsentiert. Weiß gestrichelte Kästen symbolisieren Bereiche mit hoher Apoptoserate. Maßstabbalken 200 µm. DMSO-Kontr. – DMSO-Kontrolle; NP – Nonylphenol

6 Diskussion

6.1 Proliferation und Zellüberleben

Die Besorgnis über die Möglichkeit, dass NP die Entwicklung des Nervensystems und die neuronale Funktion beeinflussen könnten, nimmt stetig zu. Es liegen Berichte vor, nach denen die Auswirkungen der Chemikalie auf die neuroendokrine Homöostase zu Veränderungen der kognitiven Funktion und neurotoxischen Gewebsschäden führen kann. Letztlich werden die meisten Ergebnisse dieser Arbeit in Hinblick darauf diskutiert, inwieweit NP seinen Einfluss über die Modifikation des physiologischen Östrogen-Signalwegs vermittelt und diesen verändert. Der Effekt von EDCs, einschließlich NP, auf das neuroendokrine System der Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse (HPG) ist dabei bezüglich evidenzbasierter Forschung am besten untersucht. Nagao et al. berichten, dass eine Exposition von Ratten mit NP dosisabhängig zu einer Erhöhung der Thyreotropin-Spiegel, nicht jedoch zur Veränderung peripherer Hormone führt (Nagao *et al.*, 2001). Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte *in vitro* die Fähigkeit von NP die Aktivität von Schilddrüsenhormonen zu unterbrechen. Sie nutzten hierfür die Zelllinie GH3 (Hypophysenzellen aus Ratte) und konnten einen inhibitorischen Effekt auf deren Zellwachstum nach NP-Exposition feststellen. Sie schließen daraus, dass dies das Risiko eines negativen Effekts auf das fötale Gehirn bergen kann, was schließlich zu kognitiver Dysfunktion führt (Ghisari & Bonefeld-Jorgensen, 2005). Im Gegensatz dazu berichten Vosges et al., dass in einem neuronalen Zellsystem von Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH)-Neuronen des Vorderhirns durch NP-Exposition eine vermehrte Anzahl an Neuronen dieses Typs in eben diesem Hirnbereich detektiert wurde. Gleichzeitig zeigten immunohistologische Färbungen jedoch, dass die Entwicklung der GnRH-Neuronen gestört war (Vosges *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit führte die Exposition von B35-Zellen mit geringen Konzentrationen NP interessanterweise auch zu einer Reduktion der Proliferationsrate der Neuroblastomzellen, wohingegen die höhere Konzentration von 1 μM NP keinen Einfluss auf die Zellteilung hatte. Der Effekt von NP könnte auf eine Beeinflussung des nukleären ER-Signalwegs zurückzuführen sein, welcher stromabwärts die Zellproliferation reguliert. Durch die Interferenz mit dem physiologischen Östrogen-Signalweg kann es zu einer Feedback-Regulation kommen, so dass die Proliferation unter dem Einfluss von geringen NP-Konzentrationen eingeschränkt wird. Weiterhin könnte NP das endogene E2 kompetitiv hemmen. Höhere NP-Konzentrationen gleichen diesen Effekt möglicherweise wieder aus oder co-aktivieren weitere Signalwege, welche die

Proliferationsrate konstant halten. Andere Studien bestätigen die Hypothese, dass der klassische Östrogensignalweg an der Zellteilung von neuronalen Zelltypen beteiligt sein könnte, auch wenn die Studienlage insgesamt inhomogen ist. Okada et al. demonstrierten, dass neurale Vorläuferzellen unter Behandlung mit E2 und auch unter dem Xenoöstrogen Bisphenol A (BPA) proliferieren. Der ER-Antagonist ICI-182,780 konnte diesen Effekt weitestgehend aufheben, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Reifung der Vorläuferzellen zu Oligodendrogliazellen (Okada *et al.*, 2010). Der selektive ER β -Agonist LY3201 führte in einer anderen Studie zu einer 2,7-fach erhöhten Proliferation von Neuronen und Gliazellen (D'Errico *et al.*, 2018). Es wurde ebenfalls der Einfluss von NP auf die Proliferation von neuronalen Stammzellen untersucht. 4-NP induzierte dabei eine signifikante Inhibition der Proliferation ab Konzentrationen von 3 μ M mit einer Sättigung ab 10 μ M. Dieser Konzentrationsbereich ist jedoch als sehr hoch anzusehen, so dass toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden können (Kudo *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Ma und Kollegen eine erhöhte Proliferationsrate der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y unter Inkubation mit NP feststellen, allerdings geht aus dieser Studie nicht hervor, welche Konzentrationen an NP im MTT-Assay eingesetzt wurden (Ma *et al.*, 2016). Außerdem charakterisiert der MTT-Assay eher, inwieweit Zellen stoffwechselaktiv sind, so dass der in dieser Arbeit eingesetzte EdU-Assay zur Ermittlung der Zellteilungsrate, bei dem der Alexa-Farbstoff zu einem bestimmten Zeitpunkt in proliferierenden Zellen inkorporiert wird, als präziser einzuschätzen ist.

Bezüglich des MTT-Assays, welcher in dieser Arbeit zur Abschätzung des toxischen Potentials der NP eingesetzt wurde, lässt sich sagen, dass mit NP-behandelte B35-Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0,05 nM bis 1 μ M keine signifikant andere Stoffwechselaktivität aufwiesen als mit DMSO-behandelte Zellen. Somit sind die eingesetzten Konzentrationen als sicher einzustufen und alle weiteren Ergebnisse der Untersuchungen lassen sich auf die Aktivierung, Inhibition oder Beeinflussung von Signaltransduktionswegen zurückführen und nicht auf generell apoptotische Wirkungen der Chemikalie. Sofern das NP seine Effekte über den klassischen Östrogensignalweg vermittelt, hängt eine spezifische Wirkung vom Expressionslevel der ER-Subtypen, eingesetzten Konzentrationen und den Isomeren im NP-Gemisch ab, so dass Ergebnisse unterschiedlicher Studien schwer zu vergleichen sind. Zelllinien und auch Primärzellen können *in vitro* unterschiedlich anfällig für NP sein. Effekte können sich allein deshalb unterscheiden, weil die Verteilung von ER α und ER β je nach Zelltyp individuell ist. Es ist lediglich bekannt, dass

im Hirngewebe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der ER β ausgeprägt ist, an den NP mit höherer Affinität bindet (Kuiper *et al.*, 1997). Im Falle der B35-Zellen wäre es sinnvoll auch die basalen, endogenen Östrogen-Level sowie die Expression der ER auf mRNA- und Proteinebene in weiteren Experimenten zu bestimmen, da es hierzu bislang keine Daten gibt. Es ist ebenfalls hinzuzufügen, dass das Kulturmedium für B35-Zellen (DMEM-H) Phenolrot enthält, welches ab einer Konzentration von 25 μ M östrogene Wirkungen entfalten kann (Berthois *et al.*, 1986; Rajendran *et al.*, 1987). Phenolrot band in einer Studie mit 0,001 % der Affinität von natürlichem E2 an den ER von MCF-7 Brustkrebszellen. Es reduzierte so die Fähigkeit exogener Östrogene, eine Signalantwort hervorzurufen (Berthois *et al.*, 1986). Das verwendete DMEM-H von Gibco weist eine Phenolrot-Konzentration von 39 μ M auf und könnte somit die Wirkung der NP überlagern. Jedoch weisen Studien lediglich eine Bindung an cytosolische und nicht membranständige ER nach (Rajendran *et al.*, 1987). Da in der vorliegenden Arbeit zusätzlich alle Zellen unter allen Bedingungen im gleichen Medium kultiviert wurden und es einen spezifischen Vergleich zur DMSO-Kontrolle in Phenolrot-haltigem Medium gab, sind dargestellte signifikante Unterschiede mutmaßlich auf den Effekt der NP zurückzuführen.

6.2 Migration und Adhäsion

Der Prozess der Neurogenese im DG beinhaltet verschiedene Stationen, unter anderem die Migration der neuen Neurone in die Schicht aus Körnerzellen. Dieser Mechanismus ist wichtig, damit die Zellen an ihren Zielort gelangen, wo sie ihre spezifischen Aufgaben wahrnehmen. Bei einer Störung des Prozesses können Zellen beispielsweise zu früh reifen und sich in falschen Regionen des Gehirns differenzieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass B35-Zellen unter Einfluss von NP im Scratch-Assay schneller migrieren, da sich die zugefügte Wunde signifikant schneller schloss als bei DMSO-behandelten Zellen. Auf der anderen Seite war die Migration der Zellen aus dem Zellverbund hinaus im Sphäroid-Assay verlangsamt. Zunächst muss festgehalten werden, dass für die Migration von Zellen die Mikroumgebung genauso eine Rolle spielt wie diverse Zelladhäsionsmoleküle. Dabei ist die Migration auf PLL, der künstlichen Matrix, eine andere, als die Migration aus einem Sphäroid heraus. Die Zelladhäsion in Geweben in Assoziation zu ihrer umgebenden Matrix oder zu Nachbarzellen ist ein Beispiel für biologische Prozesse, die sich an ihre physikalische Umwelt adaptieren (Ladoux & Nicolas, 2012). Es ist bekannt, dass E2 das Wachstum und die Migration Östrogen-abhängiger Zellen durch verschiedene Mechanismen beeinflussen kann (Liu *et al.*, 2014a; Park *et al.*, 2008). Bei Inkubation mit 1 μ M NP zeigte sich in der

vorliegenden Arbeit der größte Effekt auf die Migration. Die Aktivierung des Östrogen-Signalwegs durch verstärkte Bindung an den ER könnte stromabwärts also die Wanderung der Zellen nach sich ziehen. Im Falle des Scratch-Assays können auch Cytokine, welche durch das Zufügen der Wunde von den Zellen freigesetzt werden, dazu führen, dass sich Zellen anders verhalten als bei einer Migration aus dem Sphäroiden heraus.

Auch andere Studien konnten zeigen, dass unter Einfluss von NP die Migration erhöht ist und sich Zellen schneller in die Wunde bewegen, die im Scratch-Assay zugefügt wurde. Jedoch handelt es sich in diesen Studien nicht um neuronale Zelllinien, sondern Krebszelllinien anderer Gewebe. Es ist also nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen der NP mit denen von E2 konform gehen und ebenfalls lediglich Krebszeleigenschaften wie Migration und Invasion und keine neuronalen Eigenschaften adressiert werden. Bei Kim et al. zeigten sowohl BPA als auch NP eine Förderung der migrativen Eigenschaften von Zelllinien der Eierstöcke. Nach 96 Stunden war die Wunde unter Einfluss von NP bereits um ca. 85 % geschlossen, bei der DMSO-Kontrolle waren Zellen so gut wie gar nicht gewandert (Kim et al. 2015). Eine Studie von Lee et al. konnte zeigen, dass eine verstärkte Migration von Oligodendrocytenzellen in Zebrafischen dazu führte, dass die Zellen weniger differenzierten (Lee *et al.*, 2010). Somit könnte auch für B35-Zellen spekuliert werden, dass sie langsamer reifen, was an kürzeren Neuriten sichtbar werden müsste. Ma und Kollegen untersuchten die Proliferation, Migration und Invasion in SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit BPA und NP. Eine NP-Exposition erhöhte dabei die Fähigkeit der Neuroblastomzellen zu migrieren, was durch die Autoren auf die Bindung der Chemikalie an den ER α zurückgeführt wurde (Ma *et al.*, 2016).

Da die Sphäroide mit NP-Behandlung größer waren, muss entweder davon ausgegangen werden, dass die östrogene Wirkung der NP zu verstärkter Proliferation der Neuroblastomzellen geführt hat oder dass die Zellen im Sphäroiden nicht so dicht gepackt sind, der Zell-Zell-Kontakt abgeschwächt ist und der Sphäroid aus diesem Grund größer erscheint. Gegen eine erhöhte Proliferation, ausgelöst durch NP, spricht, dass weder im MTT-Assay noch EdU-Assay eine erhöhte Proliferation der Zellen in gemessenem Konzentrationsbereich festgestellt wurden. Jedoch konnten Magruder et al. zeigen, dass sich die adhäsionsunabhängige Proliferation einer Zelllinie im so genannten „Hanging Drop Assay“ durch Inkubation mit BPA erhöhte. Dabei spielte der membranständige GPER1 eine Rolle, der durch die Chemikalie aktiviert wurde (Magruder *et al.*, 2014). Es kann sich bei den in dieser Studie beobachteten Ergebnissen der Proliferation also um zwei unabhängige

Mechanismen handeln, je nachdem, ob die B35-Zellen an den Plastikuntergrund adhärten oder frei im Medium schwammen.

Eine weitere These zur Erklärung größerer Sphäroide unter Einfluss von NP ist der eingeschränkte Zell-Zell-Kontakt der Neuroblastomzellen untereinander. Das Netzwerk aus Zellausläufern und Zellkörpern wäre in einem solchen Fall weniger dicht. Da Zellkontakte unter anderem Cadherin- und CAM- (cell adhesion molecules) abhängig sind, würde eine Immunfluoreszenz, die sich gegen spezifische Zelladhäsionsmoleküle richtet, Aufschluss geben und sollte in weiteren Versuchen durchgeführt werden. Hier käme auch ein Westernblot zur Quantifizierung in Frage. Magruder und Kollegen konstatieren, dass ein aktivierter membranständiger ER unter anderem die Fibronectin-Matrix koordiniert. Der Mechanismus der Aktivierung des GPR30 resultiert in der Rekrutierung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ an die Zelloberfläche, was im Zuge dessen die Bildung von fokalen Adhäsionen fördert. In einer Studie mit murinen 4T1 Zellen zeigte sich nach Inkubation mit BPA durch die Aktivierung des GPR30 eine verstärkte Adhäsion der Zellen (Magruder *et al.*, 2014).

Auch die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Adhäsion der B35-Zellen nach einer Inkubation mit NP signifikant erhöht war. Die Aktivierung des GPR30 könnte also auch hier zu einer veränderten Expression bzw. Rekrutierung von Zelladhäsionsmolekülen führen. Die Konsequenzen einer gestörten Homöostase dieser Zelladhäsionsmoleküle zeigt das Beispiel einer transgenen Mauslinie, welche die extrazelluläre Domäne (EC) des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) vermehrt abspaltet. Dieser Phänotyp äußerte sich in geändertem Verhalten der Mäuse wie verstärkter gerichteter Bewegung und schizophrener Habitus. Gleichzeitig wiesen NCAM-EC transgene Mäuse eine deutliche Reduktion von synaptischen Vesikeln in Interneuronen und eine Reduktion exzitatorischer Synapsen auf (Pillai-Nair *et al.*, 2005). Inwieweit solche Konsequenzen einer gestörten Homöostase von Zelladhäsionsproteinen auch bei Kontakt von Menschen mit NP zu erwarten ist, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass NP die Zelldifferenzierung und Ausbildung von Synapsen inhibiert, was einen Einfluss auf Gedächtnis und Lernen vermuten lässt und im Folgenden näher erläutert wird.

6.3 Zelldifferenzierung

Die Auswirkungen von endokrinen Disruptoren sollen vor allem dann auftreten, wenn der Kontakt während der kritischen frühen Entwicklungsphase des Gehirns stattfindet. Die Entwicklung des Nervensystems und das endgültige neuronale Verschaltungsmuster bilden sich in einem schrittweisen Prozess heraus, der im Wesentlichen in sechs Stadien unterteilt werden kann: Zunächst entsteht aus ektodermalen Zellen eine einheitliche Population von neuronalen Vorläuferzellen, den so genannten „Precursor Cells“. Aus diesen gehen anschließend unreife Neuronen und Gliazellen hervor, wobei die Neuronen aus den Keimzonen auswandern und sich auf den Weg zu ihrem endgültigen Zielort machen, wo sie Axone ausbilden (Kandel, 2011). Diese Axone treten letztlich in Kontakt mit ausgewählten Zielzellen und manifestieren einige dieser initialen synaptischen Kontakte zu reifen neuronalen Verschaltungsmustern. Die Zelldifferenzierung kommt durch eine Aktivierung bestimmter Sätze von Genen durch regulatorische Transkriptionsproteine zu Stande, die ihrerseits durch Signale kontrolliert werden, die von Vorläuferzellen oder anderen Nachbarzellen stammen können. Die Differenzierung der Nervenzellen hängt demnach sowohl von den Zelltypen, als auch von Signalen anderer Zellen ab, die sezernierte Moleküle oder auch Bestandteile der Zelloberfläche sein können. Membranproteine transportieren die Signale über die Membran hinweg und aktivieren in der Zelle 2nd-Messenger-Systeme. Andere Rezeptoren für diffusionsfähige Signale, wie zum Beispiel Steroidhormone, befinden sich im Zellkern und regulieren die Gentranskription selbst (Purves & Williams, 2001). Änderungen im östrogenen Milieu des sich entwickelnden Gehirns, wie sie durch eine embryonale oder frühkindliche Exposition des Menschen mit NP entstehen können, beeinflussen verschiedene Aspekte der Zelldifferenzierung, einschließlich dem Auswachsen von Neuriten, deren Verzweigung, Synapsenbildung und Expression von Neurotransmittern. Die zeitlich genau abgestimmten Aktionen des komplexen Zusammenwirkens unterschiedlicher Faktoren ist also entscheidend für die korrekte Differenzierung von Nervenzellen, welche durch äußere Faktoren wie den Einfluss von Chemikalien und auch dadurch hervorgerufene epigenetische Veränderungen leicht aus dem Gleichgewicht geraten kann.

Da die Differenzierung von Nervenzellen mit einem Auswachsen von Zellfortsätzen einhergeht, wurden in der vorliegenden Arbeit die Neuritenlängen verschiedener neuronaler Zellsysteme nach NP-Exposition ausgemessen. Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Exposition von B35-Neuroblastomzellen und primären Kleinhirnneuronen mit dem NP-Gemisch von Fluka zu einer signifikanten Reduktion der durchschnittlichen Neuritenlängen

fürhte. Dieser Effekt war bereits in geringen nanomolaren NP-Konzentrationen messbar und zeigte eine Dosis-Abhängigkeit. Weiterhin reduzierte sich sowohl das zellautonome Neuritenwachstum der B35-Zelllinie als auch das Neuritenwachstum im Zellverbund bei Primärneuronen, was den signifikanten Effekt der NP zusätzlich unterstreicht.

Der Vorteil der B35-Neuroblastomzelllinie, welche in einem undifferenzierten (entspricht unreifen), wie auch differenzierten, also reiferen Stadium, kultiviert werden kann, ist, dass hiermit verschiedene Entwicklungsstadien simuliert werden können. So zeigen die Ergebnisse, dass sowohl eine Kurzzeit- als auch Langzeitexposition von undifferenzierten Zellen zu einer Verkürzung der Zellfortsätze führte. Bei reiferen Zellen manifestierte sich dieser Effekt erst nach einer Inkubationszeit von 11 Tagen, was darauf schließen lässt, dass diese nicht so anfällig für die Wirkungen der NP sind. Die Differenzierung der B35-Zellen mit cAMP führt bekanntermaßen zu einer Aktivierung der PKA, die stromabwärts die Transkription von Genen initiieren kann, die an der Neuritogenese beteiligt sind. Somit könnten die Auswirkungen der NP, die über den GPR30-Rezeptor ebenfalls Einfluss auf die Proteinkinase nehmen können, durch die artifizielle Differenzierung eventuell überdeckt sein und Effekte auf die Neuritenlängen von differenzierten Zellen aus diesem Grund nicht so deutlich hervortreten. Bezüglich der Kleinhirnneuronen, welche direkt aus der Maus stammten und aus diesem Grund als realistisches System einzustufen sind, zeigte sich ebenfalls eine zeitliche Verzögerung der Auswirkungen von NP auf die Neuritogenese und die Ergebnisse konnten verifiziert werden. In jedem Fall scheinen unreife Zellen in Bezug auf das Auswachsen von Neuriten besonders sensitiv zu reagieren, was in Hinblick auf eine frühkindliche Exposition mit NP als bedenklich einzustufen ist.

Matsunaga et al. berichteten, dass NP und andere EDCs eine Bandbreite signifikanter Störungen auf das Dendritenwachstum hippocampaler Neuronen haben, was zu psychologischen Störungen nach chronischer Exposition führen kann (Matsunaga *et al.*, 2010). In dieser Studie inhibierte 4-NP das MAP-2 vermittelte Auswachsen von Neuriten in einer Weise, die von EDC-Antagonisten bzw. Progesteron wieder aufgehoben werden konnten.

Bevan et al. exponierten die Embryos von *Xenopus laevis* mit NP und zeigten, dass nicht das Auswachsen von Neuriten, jedoch das Auswachsen der Neuriten nach Nervenwachstumsfaktor-mediierter (NGF -nerve growth factor) Differenzierung gestört war (Bevan *et al.*, 2006). Die inhibitorischen Effekte von NP wurden in diesem Falle nicht durch die Zugabe des ER-Antagonisten ICI 182,780 konterkariert, jedoch durch den G-Protein-

Antagonisten Pertussis-Toxin. Die Wirkungen von NP können also nicht exklusiv dem klassischen Östrogensignalweg zugeschrieben werden, sondern werden über den membrangebundenen ER vermittelt, der kurzfristige Wirkungen ausübt. Die Ergebnisse wurden in der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 bestätigt und zeigen die gleichen Resultate wie die der vorliegenden Arbeit. Eine signifikante Reduktion der Neuritenlängen wurde in der Studie von Bevan et al. bereits ab einer Konzentration von 100 nM NP erreicht, jedoch nur das NGF-vermittelte Auswachsen der Neuriten und nicht die alleinige Exposition mit NP. Die Autoren schlussfolgern, dass NP keinen generell inhibitorischen Effekt auf den Zellmetabolismus oder fundamentale Prozesse der Zelldifferenzierung wie die Änderung der Mikrotubuli haben, jedoch das Auswachsen von Neuriten, welches normalerweise durch NGF-Behandlung ausgelöst wird, komplett zu hemmen vermochten.

Eine Arbeitsgruppe von Kudo et al. untersuchte die Differenzierung von neuronalen Stammzellen unter Einfluss von NP anhand des Proteins MAP2, welches als Neuronenspezifischer Marker herangezogen wurde. Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit NP die Expression von MAP2 in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise verringerte (Kudo *et al.*, 2004).

Eine andere Arbeitsgruppe setzte ebenfalls MAP2 als Differenzierungsmarker ein und markierte hippocampale Neuronen in einer Immunfluoreszenz, nachdem sie sie mit 5 oder 10 μ M NP für bis zu sieben Tage exponierten. Die Neuriten waren kürzer und das Cytoplasma geschrumpft, außerdem wurden die Rezeptoren CAR (konstitutiver Androstan-Rezeptor), PXR (Pregnan X Rezeptor) und RXR α (Retinoid X Rezeptor) verstärkt in den Zellkern transloziert (Litwa *et al.*, 2016). Die Rezeptoren binden unter normalen Umständen strukturell unterschiedliche Liganden, einschließlich Steroide und Xenobiotika. Sie sind im neuronalen Gewebe lokalisiert, speziell in der BBB. Besonders der RXR ist an der Regulation des Steroid-Metabolismus sowie an der neuronalen Entwicklung und Hirnreifung beteiligt. Die Autoren proklamieren, dass diese Kernrezeptoren am Fortschreiten eines neurotoxischen Effekts von NP mitwirken. Außerdem zeigte sich, dass 12 Tage alte Kulturen nur auf die höchsten NP-Konzentrationen mit toxischen Auswirkungen reagierten, was auf eine altersabhängige Reaktion neuronaler Zellen schließen lässt. Dieses Ergebnis geht mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen konform, dass differenzierte B35-Zellen ebenfalls erst nach längerer Inkubationszeit mit einer Reduktion der Neuritenlänge reagierten (Litwa *et al.*, 2014).

Yokosuka et al. konnten deutliche Dosis-abhängige Effekte von NP auf das Dendritenwachstum hypothalamischer Neurone feststellen. Sie markierten ebenfalls MAP2-positive Bereiche der Zellen, um zwischen Dendriten und Axonen zu diskriminieren. Stimulatorische Auswirkungen nach einer siebentägigen Inkubation waren bei den Konzentration 10 und 100 nM festzustellen, wohingegen 1 μ M NP die MAP2-positiven Bereiche signifikant verringerte. Dabei hatte NP eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve wie E2 und war genauso effektiv. Der unterliegende Mechanismus bleibt dabei weitestgehend unklar (Yokosuka *et al.*, 2008).

Nishimura und Kollegen untersuchten ebenfalls den Einfluss von NP-Exposition auf eine neurale Zelllinie. Sie verwendeten PC12-Zellen, welche sie zunächst für drei Tage mit 5 μ M NP in Kontakt brachten und danach mit NGF differenzierten (Nishimura *et al.*, 2014). Da die Exposition mit der Chemikalie und die Differenzierung mit NGF zeitlich versetzt waren, ist nicht davon auszugehen, dass NP die Wirkung des Differenzierungsreagenz physikalisch störte, indem es beispielsweise an den NGF-Rezeptor band. Die Länge der Zellfortsätze war im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich reduziert, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Anschließend inkubierten die Forscher die PC12-Zellen für insgesamt eine Woche mit geringeren Konzentrationen NP, bevor sie die Zellen wiederum für drei Tage mit NGF differenzierten. Hier zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Neuritenlängen von 0,1 bis 100 nM NP, die sich jedoch bei jeder Bedingung signifikant zur Negativkontrolle unterschied. In einem weiteren Schritt exponierten Nishimura et al. PC12-Zellen zunächst für eine Woche mit 1 nM NP, eine weitere Woche ohne die Chemikalie, differenzierten die Zellen für drei Tage mit NGF und maßen schlussendlich die Länge der Zellfortsätze. Auch nach Entzug der NP für eine Woche war anschließend die Differenzierung der PC12-Zellen eingeschränkt, was darauf schließen lässt, dass NP langfristige Effekte auf Transkriptionsebene oder epigenetische Veränderungen vermittelt. Die Autoren folgern, dass NP in die zelluläre Maschinerie der Zelldifferenzierung eingreifen, dass Modifikationen in den Zellen auch nach längerer Zeit erhalten bleiben und dort auf die Funktionen Einfluss nehmen können.

Eine einzelne Studie an Kleinhirnneuronen untersuchte den Effekt von Umweltöstrogenen auf das Wachstum von Purkinje-Zellen *in vivo* mithilfe neugeborener Ratten. Die Injektion von 500 μ g/Tag von NP in die Cerebrospinalflüssigkeit für vier Tage hatte keine morphologischen Änderungen der Zellen zur Folge, jedoch war die maximale Dendritenlänge nach NP-Administration, wenn nicht signifikant, so doch leicht verringert (Shikimi *et al.*, 2004). Die

Gründe, welche die unterschiedliche Effektivität von NP auf Purkinje-Zellen *in vivo* und Kleinhirnneuronen *in vitro* erklären können, bleiben ungeklärt.

Insgesamt fällt auf, dass Zelllinien in den angeführten Studien insgesamt sensibler auf NP reagieren als Primärzellen und sich Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung, messbar an verringerter Neuritogenese, bereits in einem geringeren Konzentrationsbereich manifestieren. In der vorliegenden Arbeit konnten bei primären Kleinhirnneuronen ebenfalls erst nach 11 Tagen Inkubation signifikante Auswirkungen auf das Auswachsen von DiI-markierten Zellfortsätzen festgestellt werden, wenn die Neuronen mit geringen NP-Konzentrationen von 1 bzw. 10 nM NP behandelt wurden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Alterung der Kulturen die Neuronen anfälliger für exogene Faktoren macht. Der beobachtete Effekt kann mit einer generellen Seneszenz der Zellen oder einer Akkumulation der lipophilen Chemikalie zusammenhängen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kettenreaktion kommt, bei der sensible Primärzellen kürzere Neuriten ausprägen, weniger Synapsen ausbilden und dadurch geringere Mengen an Neurotransmittern in das umgebende Medium sezernieren, so dass es in der Folge zu einer Beeinflussung der benachbarten Zellen im neuronalen Netzwerk kommt. Somit muss bei der Bewertung der NP-Neurotoxizität eine Langzeitexposition kalkuliert werden, die sich eventuell auch im adulten Gehirn manifestieren kann, wenn menschliche Neuronen zusätzlich mit erhöhtem oxidativen Stress und anderen neuropathologischen und –inflammatorischen Prozessen konfrontiert sind.

Neben dem Einfluss des NP-Gemisches auf das Auswachsen von B35-Neuriten wurde untersucht, inwieweit sich der isolierte Einsatz verschiedener NP-Isomere auf die Differenzierung der Neuroblastomzelllinie auswirkt. Das östrogene Potential der eingesetzten Isomere NP65, NP111 und NP112 zeigte im Hefe-Screen nur eine mittlere Östrogenität. Sie lag im Vergleich zum natürlichen Hormon E2 mit einer relativen Potenz von 0,25 bis 0,80 im mittleren Bereich (Gabriel *et al.*, 2008; Preuss *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass die am β -Kohlenstoffatom verankerte Alkylverzweigung der NP mit der Kavität des ER interagiert, die um den C-Ring des E2 im Östrogenrezeptor-Östrogen-Komplex (ER-E) entsteht. Diese Hohlräume der Liganden-Bindungsdomäne erlauben geeigneten sterischen Gruppen der richtigen Größe in die freie Bindungsstelle zu penetrieren und dort zu binden (Shioji *et al.*, 2006). Die variable Östrogenität der Isomere kann gleichzeitig erklären, warum sie unterschiedliches Verhalten in Zellkultursystemen haben. Alle eingesetzten Isomere zeigten sich weniger potent bezüglich ihrer negativen Wirkung auf das Auswachsen von Neuriten als das NP-Gemisch, was darauf schließen lässt, dass die Zusammensetzung der technischen

Mixtur aus Isomeren besteht, die wirksamer sind als die isolierten Isomere NP65, NP111 und NP112. Außerdem ist über zelluläre und zellfreie Bindungsassays bislang nur die Bindung von NP an die ER α und ER β aufgeklärt, so dass die Effekte auf den membranständigen ER noch nicht mit einbezogen sind und damit transkriptionelle Veränderungen durch kurzfristige Modulationen überdeckt sein können (Blair, 2000; Gutendorf & Westendorf, 2001; Laws *et al.*, 2000). Des Weiteren kann spekuliert werden, dass die Effekte verschiedener Isomere in einem Gemisch synergieren und eine Wirkung durch die gleichzeitige Aktivierung diverser Signaltransduktionen verstärkt wird.

Einen weiteren Aspekt der Zelldifferenzierung stellt die Verzweigung von Neuriten dar. Die Neuritenzahl kann einen Hinweis auf den Grad der Differenzierung von Zellen geben, außerdem erhöhen Verzweigungen den Zell-Zell-Kontakt und die Plastizität neuronaler Prozesse. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von NP auf das Verzweigungsmuster der B35-Zellen nach Inkubation mit einem NP-Gemisch festgestellt werden, die meisten Zellen hatten zwei Primärneuriten. Bevan *et al.* untersuchten den Einfluss von NP auf den Verzweigungsgrad von Rückenmarksneuronen des Krallenfrosches und stellten fest, dass sich die Anzahl primärer Neuriten weder in Ethinylestradiol- (EE2), noch NP-behandelten Zellen signifikant von der DMSO-Kontrolle unterschied. Jedoch war die Anzahl an Verzweigungspunkten unter 10 μ M NP und auch unter EE2 deutlich erhöht (Bevan *et al.*, 2006).

6.4 Cytoskelettale Reorganisation

Damit Zellen ordnungsgemäß funktionieren, müssen sie sich in ihrer Matrix organisieren und mechanistisch mit anderen Zellen und der Umwelt interagieren. Sie müssen korrekt geformt und physisch robust sein sowie die Fähigkeit besitzen, sich zu teilen, zu wandern und ihre inneren Komponenten unter bestimmten Bedingungen neu zu arrangieren. Die unterschiedlichen cytoskelettalen Funktionen gründen sich auf das Verhalten dreier Familien von Proteinfilamenten, den Aktin-Filamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten (Bisbal & Sanchez, 2019; Ganzinger & Schwille, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer niedrigen und einer hohen NP-Konzentration auf die Länge und Anzahl von F-Aktin-Filamenten und α -Tubulin-Filamenten in B35-Zellen untersucht. Aktin-Filamente determinieren hierbei die Form der Zelloberfläche und sind für die Wanderung der gesamten Zelle nötig. F-Aktin ist der Hauptbestandteil dendritischer Spindeln und ermöglicht sowohl stabile, als auch dynamische Prozesse in Neuronen. Es zeigt

sich, dass F-Aktin an der Bildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt ist, da es die schnelle Ausdehnung der Dendriten ermöglicht (Matsuzaki *et al.*, 2004). Die Mikrotubuli legen die exakte Position von membranassoziierten Zellorganellen fest und haben Einfluss auf den intrazellulären Transport. Alle cytoskelettalen Filamente interagieren ihrerseits mit hunderten von Zusatzproteinen, welche hier jedoch nicht untersucht wurden.

Die Veränderung der cytoskelettalen Organisation wurde in der vorliegenden Arbeit bereits indirekt durch ein verringertes Auswachsen von Neuriten in B35-Zellen gezeigt. Durch eine Markierung von F-Aktin und α -Tubulin in einer Immunfluoreszenzfärbung wurden Änderungen in der Zellmorphologie zusätzlich mit konfokaler Mikroskopie sichtbar gemacht und Ergebnisse verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit 1 nM NP dazu führte, dass B35-Zellen keine längeren, jedoch mehr Tubulin-Filamente aufwiesen; die höhere NP-Konzentration blieb dabei ohne Wirkung. Tubulin stabilisiert das Cytoskelett, was bei einer Zerstörung der Filamente dazu führt, dass Zellen weniger wandern. An der Stabilisierung von Mikrotubuli sind in der Regel MAP-Kinasen beteiligt. Werden diese phosphoryliert, so binden sie weniger an die Mikrotubuli und stabilisieren ihre Struktur schlechter (Tanaka & Sabry, 1995). Da in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der ERK-Phosphorylierung unter dem Einfluss von NP festgestellt wurde, könnten Tubulin-Filamente und damit Zellen besser stabilisiert sein und Zellen schneller migrieren.

Im Vergleich mit anderen Studien zeigen sich kontroverse Ergebnisse. Kein Effekt von NP wurde auf das Cytoskelett von Sertoli-Zellen festgestellt. Die Inkubation bewirkte im Gegensatz zu E2 keine Unterbrechung und Neuorganisation des Tubulins (Nakagomi *et al.*, 2001). Matsunaga *et al.* beobachteten, dass NP in der Lage sind, an MAP2C zu binden, welches normalerweise die Stimulation einer Zusammenlagerung von Tubulin-Filamenten mediiert. NP erwies sich dabei als inverser Antagonist, der eine Stabilisierung der Tubulin-Filamente verhinderte, jedoch in Anwesenheit von Progesteron antagonisiert wurde (Matsunaga *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde allerdings lediglich die Polymerisation der Tubulin-Filamente durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität bestimmt, jedoch wurden keine einzelnen Filamente gezählt. Eine verringerte Polymerisation könnte also auch so interpretiert werden, dass mehr Filamente als Einzelfasern bestehen bleiben, was eine erhöhte Anzahl der Tubulin-Filamente in der vorliegenden Arbeit erklären würde.

In einer Dissertation aus dem Jahre 2017 wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet: Die Differenzierung von PC12-Zellen mit NGF und die anschließende Behandlung mit 4-NP führten dazu, dass die Expression von Tubulin, das Polymer-Monomer-Gleichgewicht und die

Mikrotubuli-Organisation gehemmt wurden (Carreon, 2017). Die Wissenschaftlerin identifizierte mechanistisch ein G-Protein G $\beta\gamma$, welches normalerweise am NGF-vermittelten Auswachsen der Neuriten beteiligt ist und scheinbar mit NP interferiert. Aus dieser Studie geht jedoch nicht hervor, in welchen Konzentrationen die NP eingesetzt wurden, so dass keine Vergleiche gezogen werden können.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von NP auf die Organisation des Aktin-Gerüsts untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine geringe NP-Konzentration von 1 nM dazu führte, dass sich insgesamt weniger F-Aktin-Fibrillen ausbildeten. Die höhere Konzentration von 1 μ M führte zu keiner Änderung der Fibrillenanzahl. Im Gegensatz dazu war die Länge der Filamente unter der geringen NP-Konzentration nicht verändert, jedoch bei Inkubation mit 1 μ M erhöht.

Auch Bevan et al. proklamieren, dass ein anderes Verzweigungsmuster von *Xenopus leavis* Neuronen nach NP-Exposition und vorangegangener NGF-Behandlung darauf schließen lässt, dass NP Änderungen der fundamentalen Differenzierungsprozesse in Zellen auslösen, welche mit Verkürzung der Neuriten und Veränderung in der Zusammenlagerung von Mikrotubuli einhergehen (Bevan *et al.*, 2006).

Bezüglich der Umweltchemikalie BPA, die ebenfalls als EDC angesehen wird, gibt es bereits einige Studien, die einen Zusammenhang zwischen der östrogenen Wirkung und cytoskeletaler Reorganisation herstellen. Xiao et al. behandelten Sertoli-Zellen *in vitro* mit 0,4 bis 200 μ M BPA für bis zu 18 Monate. Sie wiesen nach, dass Aktin-Filamente fehllokalisiert, mit spitz zulaufenden Endkappen und unterbrochener Polymerisation auf die Behandlung reagierten. Neben der Hemmung der Aktin-Dynamik bewirkte BPA zusätzlich, dass der Vesikel-abhängige Transport und die korrekte Lokalisierung der Aktin-Regulatorproteine c-Src und Annexin II in den Sertolizellen beeinträchtigt waren (Xiao *et al.*, 2014).

Xu et al. stellten eine verstärkte Differenzierung hippocampaler Neuronen fest, die mit E2 oder BPA behandelt wurden. Dies ging mit einer erhöhten Bildung von F-Aktin einher, welche die Autoren über die Quantifizierung von Rhodamin-Phalloidin-markierten Zellen unter Zuhilfenahme der Software MetaMorph analysierten. Die Überprüfung der Fluoreszenz-Intensität deutete auf eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit hin, bei der ab einer Konzentration von 10 nM BPA F-Aktin-Bündel deutlich zunahmen. Die Autoren stellten zusätzlich Änderungen in der Expression von RhoA (Ras homolog gene family, member A) und Rac

fest. Diese beiden könnten an der Polymerisation von Aktin und Bildung von Stressfibrillen beteiligt sein (Xu *et al.*, 2014).

Insgesamt lässt sich sagen, dass es ein Gleichgewicht zwischen Tubulin und Aktin gibt. Es gibt Evidenz, dass sich Tubulin besonders in die Regionen einer Zelle bewegt, in der weniger F-Aktin vorhanden ist. Somit könnte die verringerte Anzahl an F-Aktin unter dem Einfluss von NP ihrerseits die Tubulin-Filamente anregen, sich in periphere Domänen auszubreiten, um einen „Steady-State“ Zustand zu erreichen (Suter & Forscher, 2000).

Der Mechanismus, über den EDCs auf die Reorganisation des Cytoskeletts Einfluss nehmen könnten, wurde von einer Arbeitsgruppe beleuchtet, die mit einer immortalisierten Prostatazelllinie arbeitete. Sie aktivierten den membranständigen GPR30 mithilfe des Agonisten G1, was im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase-cAMP-PKA-Signalkaskade führte und die ERK1/2-Phosphorylierung abschwächte. Am Ende stellten sie eine verringerte Anzahl an F-Aktin-Bündeln fest (Lau *et al.*, 2017). Die Aktivierung des GPR30 und der stromabwärts liegenden Adenylatcyclase und PKA, sowie die Reduktion des ERK-Signalwegs könnten dafür sorgen, dass geringere Konzentrationen von NP (1 nM) negative Auswirkungen auf die Organisation von F-Aktin haben. Die höhere Konzentration NP könnte über einen intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom zu einer Aktivierung der RhoA und längerfristig Rac führen, die die Zusammenlagerung von F-Aktin und Stabilisierung der neuronalen Morphologie bewirken (Rex *et al.*, 2009).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass unter dem Einfluss von NP verschiedene Parameter der Zellmorphologie verändert sind. Die zugrunde liegenden Mechanismen und beteiligten Signalkaskaden bedürfen dabei weiterer Aufklärung. Weiterhin stellt sich die Frage nach der Konsequenz und funktionellen Auswirkung einer solchen Umorganisation des Cytoskeletts. Hinweise zu möglichen Folgen einer Störung der Aktin-Organisation in Neuronen liefern einige wenige Studien der letzten Jahre, welche sich vorwiegend auf die Langzeit-Potenzierung und synaptische Plastizität beziehen. Die Zerstörung von F-Aktin in der CA1-Region des Hippocampus nach Erinnerungserwerb führte in einer Studie zu Amnesie (Fischer *et al.*, 2004), während eine Inhibition der F-Aktin Polymerisierung selektiv die Erhaltung der synaptischen Plastizität unterbrach (Honkura *et al.*, 2008; Rex *et al.*, 2009). Inwieweit NP die Synaptogenese und damit Lernprozesse beeinflussen kann, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

6.5 Synaptogenese und Lernen

Die Verschaltungsmuster in der Frühphase der Entwicklung entsprechen nicht dem Muster reifer neuronaler Verknüpfungen. Die Aktivität von Neuronen entscheidet zu späterem Zeitpunkt darüber, ob eine Synapse als solche beibehalten oder funktionslos wird. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung, inwieweit NP in der Lage sind die Entwicklung des Nervensystems in einer Frühphase der Entwicklung zu stören. Wenn davon ausgegangen wird, dass NP ihre Wirkung vornehmlich über eine Beeinflussung der Östrogen-Signalwege vermitteln, stellt sich zunächst die Frage, welchen Einfluss Östrogene auf die Synaptogenese haben. Unter physiologischen Bedingungen ist es wahrscheinlich, dass Östrogene die Synaptogenese initiieren, sobald sie das Gehirn penetrieren. Sie erhöhen dabei die Dichte dendritischer Dornfortsätze und synaptischer Endknöpfchen sowie die Innervation der Dornen (MacLusky *et al.*, 2005b; Weiss, 2007). Somit führen sie zu schnellen Effekten auf das Hippocampus-abhängige Erinnerungsvermögen. Die exakten Konzentrationen an Östrogenen direkt im Gehirn sind dabei in Studien noch nicht ermittelt worden. E2 bindet mit etwa gleicher Affinität an ER α und ER β , wobei im Gehirn vorwiegend der ER β vorkommt, an den NP mit höherer Affinität bindet (Gutendorf & Westendorf, 2001; Kuiper *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NP die Anzahl synaptischer Vesikel und damit die Übertragung neuronaler Signale an Nachbarzellen mutmaßlich reduziert. Mithilfe des Vesikelproteins Synaptophysin, welches in der präsynaptischen Membran von Vesikeln einen hexameren Kanal bildet, wurde die Anzahl der Synapsen in Relation zur Länge der Zellfortsätze bestimmt. Dass sich in reinen Primärkulturen aus Kleinhirneuronen von Ratten funktionstüchtige Synapsen entwickeln, zeigen diverse Studien in elektrophysiologischen Untersuchungen (Crepel & Jaillard, 1991; Ito & Takeichi, 2009; Linden, 1997; Lonart *et al.*, 2003; Losi *et al.*, 2002; Uemura *et al.*, 2010). Auch war die Fluoreszenzintensität der einzelnen Vesikel abgeschwächt, was darauf schließen lässt, dass weniger Synaptophysin exprimiert wurde und es somit zu verringerter Neurotransmitterfreisetzung kommt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Synapsen somit einen Teil ihrer Funktion verloren haben, weniger beansprucht wurden und sich ggf. zurück gebildet haben. Möglich wäre ebenfalls, dass sich durch die Exposition mit NP die Synapsen initial gar nicht ausgebildet haben oder aufgrund von neurotoxischen Effekten eine Schädigung der Primärzellen stattgefunden hat. Für die Klärung dieser Frage wäre es wichtig, die Dichte der synaptischen Vesikel nicht nur an Tag 11, sondern auch schon zu einem früheren Zeitpunkt zu quantifizieren, um einen Verlauf über die Zeit zu beobachten. Weitere Untersuchungen in

gemischten neuronalen Kulturen sollten folgen. Aus den Ergebnissen lässt sich lediglich ableiten, dass weniger synaptische Verbindungen vorhanden sind, jedoch lassen sich keine Rückschlüsse auf die Funktionalität dieser Synapsen ziehen. Mithilfe einer Co-Lokalisierung von prä- und postsynaptischen Markern oder des Einsatzes von Fluorophoren, welche Neurotransmitterfreisetzungen sichtbar machen, könnten Effekte von NP noch genauer beschrieben werden. Einen Einfluss anderer EDCs auf die Synaptogenese zeigten MacLusky et al. im Jahre 2005 (MacLusky *et al.*, 2005a). Im Hippocampus führt die Administration mit E2 zu einer transienten Erhöhung der synaptischen Dichte in der CA1-Region des Hippocampus, die durch den endokrinen Disruptor BPA jedoch wiederum inhibiert wurde. Yokosuka et al. führten Immunfluoreszenzen an fötalen Hypothalamuszellen durch, die sie mit 1 bis 1000 nM NP für sieben Tage behandelt hatten. Sie kalkulierten die synaptische Dichte aus dem Quotienten von MAP2- und Synapsin I -positiven Bereichen. MAP2 diskriminierte dabei die Dendriten, während Synapsin I als Regulator der Transmitterfreisetzung die Anzahl synaptischer Vesikel repräsentierte. Sie konnten zeigen, dass die geringeren NP-Konzentrationen von 1 nM und 10 nM die synaptische Dichte erhöhten, während 100 nM und 1 µM sie signifikant verringerten (Yokosuka *et al.*, 2008). Der gleiche Effekt wurde bei E2-Administration beobachtet, inhibitorische Mechanismen hoher Konzentrationen von Östrogenen oder Östrogen-wirksamen Chemikalien sind jedoch weiterhin unbekannt. Somit lassen die vorliegenden Daten spekulieren, ob NP durch die Östrogen-abhängige Inhibition der Synapsenbildung zu kognitiver Dysfunktion führen kann. Zusätzlich kann diskutiert werden, ob die Beeinträchtigung der normalen Gedächtnisfunktion während des Alterns durch die Exposition mit NP verschlimmert werden könnte, wenn die endogene Östrogenproduktion abnimmt.

Da die Sensitivität chemischer Synapsen wandelbar ist, weisen diese eine Plastizität auf, die Voraussetzung für Gedächtnis und Lernen ist. Diese Regulierbarkeit oder synaptische Plastizität wird von zwei Arten von Vorgängen gesteuert: Erstens Vorgänge innerhalb des Neurons, wie Änderungen des Membranpotenzials oder das Abfeuern von Aktionspotentialen, und zweitens extrinsische Prozesse, wie der synaptische Eingang von anderen Neuronen (Kandel, 2011). Langzeitänderungen in der Aktivität chemischer Synapsen sind entscheidend für das Lernen. Störungen des neuronalen Entwicklungsverhaltens durch die Exposition mit EDCs wurden deshalb schon lange vermutet, weil die Entwicklung des ZNS stark durch endogene Hormone und hormonell regulierte Ereignisse beeinflusst wird. In den letzten Jahren haben einige Studien über den Effekt von perinataler NP-Exposition auf die

Verhaltensmerkmale im Gehirn der Nachkommen von Versuchstieren berichtet. Negishi et al. behandelten Ratten perinatal von Gestationstag drei bis 20 Tage nach der Geburt oral mit einer niedrigen oder hohen Dosis NP, so dass sowohl eine transplazentale, als auch laktationale Exposition der F1-Generation erreicht wurde. Männliche Nachkommen reagierten auf einen externen Stimulus mit Angst- und Vermeidungsverhalten in beiden Konzentrationsbereichen (Negishi *et al.*, 2004).

Bei Sprague-Dawley Ratten, die mit NP-Dosen von 50, 100 oder 200 mg/kg/Tag in der kritischen Phase der embryonalen Entwicklung des ZNS (Gestationstag 9-15) behandelt wurden, zeigten sich Änderungen in Lernen und Gedächtniskapazität bei männlichen Nachkommen. Möglicherweise wurde die Ultrastruktur des Hippocampus gestört, was zu einer geringeren Gehirnleistung der F1-Generation führte (Jie *et al.*, 2010). Mao et al. untersuchten zusätzlich, welche Auswirkungen eine chronische Exposition über 90 Tage auf die Gehirnleistung von Mäusen hat. Sie zeigten Einschränkungen im Erkundungsverhalten, Gedächtnis und Lernen neuer Aufgaben (Mao *et al.*, 2011).

Einen direkten Einfluss von NP auf die Langzeit-Potenzierung verschiedener Hirnbereiche wurde in einer elektrophysiologischen Studie untersucht (Ogiue-Ikeda *et al.*, 2008). Eine Konzentration von 100 nM NP führte dabei zur Suppression der Langzeit-Potenzierung in der CA1 von ca. 10 % und einer Erhöhung in der CA3 und im DG von ca. 10 %. Die Langzeit-Potenzierung ist dabei nicht nur der Mechanismus des Vergessens, sondern auch die Korrektur falsch gespeicherter Informationen. Der Effekt war dabei anders als der des E2. Die Autoren proklamieren, dass nanomolare Konzentrationen von NP im Blutplasma signifikante Auswirkungen auf die Gedächtnisfunktion haben könnten.

6.6 ERK-Signalweg

Diverse Signalwege sind an der Bildung des Gedächtnisses im Hippocampus beteiligt, einschließlich des MAPK/ERK-Signalwegs. E2 kann viele dieser Signalwege innerhalb kurzer Zeit aktivieren. In Studien stieg die ERK-Phosphorylierung innerhalb von 15 Minuten nach Exposition hippocampaler Neuronen mit dem Hormon an. Dabei war es egal, ob E2 oder ein Membran-impermeables, an BSA-konjugiertes E2 verwendet wurde, welches nur den membranständigen GPR30 und nicht den nukleären ER zu aktivieren vermag (Wade & Dorsa, 2003; Watters *et al.*, 1997). Der membrangebundene ER partizipiert demnach an der Östrogen-vermittelten Wirkung auf die ERK-Kinase (Okada *et al.*, 2010). In adulten Ratten, welche E2 direkt in den dorsalen Hippocampus oder lateralen Ventrikel injiziert bekamen,

zeigten sich die Effekte sogar schon nach fünf Minuten, was auf eine sehr schnelle Signaltransduktion des Hormons *in vivo* schließen lässt (Boulware *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2008). Dementsprechend blockieren Inhibitoren der MAPK (MEK), die ausschließlich ERK phosphoryliert, die E2-induzierte ERK-Aktivierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Fernandez *et al.*, 2008; Fortress *et al.*, 2013). Die Gedächtnisleistung, die normalerweise durch E2 oder BSA-E2 verstärkt wird, ist in diesem Falle nicht erhöht. Diese Ergebnisse zeigen zwei wesentliche Erkenntnisse auf: Zum einen ist die Förderung des Erinnerungsvermögens abhängig von den Signalwegen innerhalb der Zelle. Zum anderen können die Wirkungen von E2 auf ERK und die Gedächtniskonsolidierung durch eine membranundurchlässige oder durchlässige Form von E2 nachgeahmt werden, wodurch eine Schlüsselrolle von endokrinen Disruptoren in der Interferenz mit natürlichen Hormonen veranschaulicht wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die Phosphorylierung der ERK1/2 Kinase in B35-Zellen durch die Exposition mit NP signifikant reduziert wurde. Bereits nach einer 15-minütigen Inkubation von B35-Zellen mit einem NP-Gemisch verringerte sich die Aktivität der ERK1/2 Kinase, wobei die Inhibition nach 30 Minuten ihren Höhepunkt erreichte. Dabei war eine NP-Konzentration von 100 nM nicht wirksam, sondern nur die höchste Konzentration von 1 µM. Es wurden für die Experimente nur undifferenzierte B35-Zellen verwendet, da vorangegangene Versuche gezeigt haben, dass eine Differenzierung der Zellen mit cAMP die konstitutive ERK1/2-Expression beeinflusst und sich somit der Effekt nicht mehr exklusiv auf NP zurückführen lässt. Nach einer dreitägigen Behandlung zeigten NP hingegen keinen Einfluss auf die basale ERK-Expression undifferenzierter Zellen. Dies bedeutet, dass NP einen partikulären Effekt auf die ERK-Aktivität, nicht jedoch auf die ERK-Expression haben. Die Inhibition der ERK kann wiederum erklären, warum die Neuritenlängen der B35-Zellen unter dem Einfluss von NP reduziert sind. Die stromabwärts liegenden Zielmoleküle der Kinase haben Einfluss auf die Differenzierung von Zellen. Da die Differenzierung von Nervenzellen mit dem Auswachsen von Neuriten einhergeht, könnte eine verringerte Phosphorylierung und damit Aktivierung der ERK-Kinase eine abgeschwächte Differenzierung nach sich ziehen, was schlussendlich zu verkürzten Neuriten führt.

Eine Studie aus dem Jahre 2008 bestätigt die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit (Kusunoki *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe inkubierte PC12-Zellen vor und nach NGF-Differenzierung mit 56 µM p-NP für 10 Minuten bis zu zwei Stunden. NP allein blieb dabei ohne Effekt, wohingegen die vorherige Differenzierung der Zellen eine Änderung der ERK-

Aktivität nach sich zog. Nach 10 und 30 Minuten hatte NP eine deutliche Reduktion und Verzögerung der ERK1/2-Phosphorylierung zur Folge. Die Autoren schlussfolgern, dass NP die Differenzierung durch NGF abschwächen kann. Weiterhin wurde eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach NP-Administration festgestellt, was auf kurzfristige Regulationen von Signaltransduktionen schließen lässt. Dieser Aspekt ist jedoch als kontrovers zu betrachten, da eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration unter physiologischen Bedingungen zu einem gesteigerten Neuritenwachstum beiträgt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich bei den in dieser Studie beobachteten Veränderungen um Apoptosereaktionen der Zellen handelt, da die eingesetzte Konzentration von NP als sehr hoch einzuschätzen ist und auch Aktivierungen der Caspase-Kaskade nachgewiesen wurden (Kusunoki *et al.*, 2008).

Interessanterweise postulieren Bulayeva und Kollegen einen gegenteiligen Effekt von NP auf die ERK-Phosphorylierung (Bulayeva & Watson, 2004). Drei bis 30 Minuten nach Administration von p-NP bei einer Hypophysenzelllinie stieg die ERK-Aktivität an. Sie setzten hierbei einen ELISA-Assay mit fixierten Zellen ein, was es erlaubte sehr geringe subpicomolare/nanomolare Konzentrationen von 0,00001 nM bis 10 nM NP zu applizieren. Das p-ERK-Signal wurde dann mittels Crystal Violet auf die Zellzahl normalisiert. NP führten in diesem Experiment zu keiner initialen, jedoch zu einer verzögerten Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung, welche nach 30 Minuten ihren Höhepunkt erreichte. Innerhalb von zwei Konzentrationsbereichen (10^{-14} M bzw. 10^{-6} - 10^{-5} M) erhöhten NP die Phosphorylierung von ERK, im Bereich dazwischen hatten sie keine Auswirkungen. Diese bimodale Wirkungsweise mit einer lückenhaften Wirkung in mittleren Konzentrationsbereichen wurde auch in vorliegender Arbeit beobachtet und erinnert an die Wirkungsweise von E2 (Watson *et al.*, 1995). Weiterhin erklären die Autoren, dass sich vor allem $\text{ER}\alpha$ -Rezeptoren auf der Oberfläche der Hypophysenzelllinie befinden (Bulayeva & Watson, 2004). Wenn davon ausgegangen wird, dass NP mit einer höheren Affinität an den $\text{ER}\beta$ bindet, so kann dies erklären, warum unterschiedliche Auswirkungen auf die ERK-Phosphorylierung beobachtet wurden.

Vinas und Kollegen kombinierten im Jahre 2013 verschiedene Xenoöstrogene mit dem natürlichen Hormon (Vinas & Watson, 2013). Sie nutzten einen Immunoassay mit mittlerem Durchsatz, um die ERK-Phosphorylierung in einer Rattenzelllinie zu quantifizieren. Einzelne EDCs riefen dabei eine nicht-monotone ERK-Aktivierung im femtomolaren bis nanomolaren Bereich hervor, bei einer Kombination verschiedener Substanzen, inklusive NP, mit

nanomolaren Konzentrationen E2, wurde die physiologische Östrogenantwort unterdrückt. Die Kombination von Gemischen in einer kontaminierten Umwelt kann somit zu Störungen der hormonellen Mechanismen der Zellregulation und nachgeschalteten funktionellen Antworten auf physiologische Östrogene führen.

In einer Studie von Bevan et al. wurde indessen keine Beeinflussung des MAPK-Signalwegs in *Xenopus laevis* und PC12-Zellen nachgewiesen (Bevan *et al.*, 2006). NP in mikromolaren Konzentrationen blieb ohne Effekt (weder negativ noch positiv) und interferierte nicht mit der NGF-induzierten Aktivierung des MAPK-Signalwegs. Hierbei fokussierten sich die Autoren jedoch auf eine 15 minütige Inkubation der Zellen mit 5 μ M NP. Da sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Änderungen des Phosphorylierungsstatus jedoch auch erst nach längerer Inkubationszeit manifestierten, wurde ein Effekt im Falle von Bevan mutmaßlich unterschätzt.

Es gibt bislang nur eine Studie, welche einzelne NP-Isomere hinsichtlich ihres Effekts auf die Aktivierung des ERK-Signalwegs untersucht hat. Die beiden Isomere NP41 und NP42 wurden von Günther et al. synthetisiert und isoliert und erlauben somit erste Einblicke in eine Isomer-spezifische Beurteilung der NP-Wirkung (Guenther *et al.*, 2006). ERK1/2 und p38-Signalwege waren bei Zellen, die in der zitierten Studie mit geringen Konzentrationen NP41 oder NP42 exponiert waren (1-20 μ M bei NP41; 0,1-1 μ M bei NP42), signifikant inhibiert (Liu *et al.*, 2014b). Da beide Isomere eine ähnliche Struktur mit gleicher Kettenlänge sowie gleichen α - und β -Substituenten aufweisen, ist es in diesem Fall schwierig, eine östrogene Wirkung aufgrund der Struktur abzuschätzen, welche die Ergebnisse erklären könnte.

Es kann konstatiert werden, dass NP einen Dosis-Wirkungsbereich haben, der je nach Zelllinie, Assay-System und NP-Zusammensetzung variiert. Aus diesem Grund können die Experimente, die einen Einfluss von NP auf die ERK-Phosphorylierung untersuchten, nicht miteinander verglichen werden. Andererseits lassen die Ergebnisse vermuten, dass es sich bei NP auch in subpicomolaren Konzentrationen um potente endokrine Disruptoren handelt, die auch bei inaktivem genomischem Signalweg noch toxische Effekte haben können.

Einen Effekt auf Transkriptionsebene, welcher den Einfluss von NP auf den MAPK-Signalweg erklären kann, wurde im Jahre 2011 nachgewiesen. Eine Studie von Choi et al., welche unterschiedliche Mikro-RNAs (miRNA) analysierte, konnte zeigen, dass nach Inkubation von Sertolizellen mit NP unter anderem die miRNA135a herauf reguliert war. Die Änderung in der miRNA135a-Expression war dabei auf ein 20,6-faches der physiologischen

Expression zu beziffern. Eine kanonische Signalweganalyse identifizierte Bestandteile, die von einer starken Hochregulation dieser spezifischen miRNA betroffen sein könnten. Eine Hemmung des stromabwärts gelegenen ERK/MAPK-Signalwegs schien dabei sehr wahrscheinlich zu sein (Choi *et al.*, 2011).

Der miRNA135a wird auch eine Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zugesprochen, der in die Differenzierung von Oligodendrocytenzellen involviert ist. Im nächsten Abschnitt wird es darum gehen, ob NP ihre Wirkungen auf das Nervensystem auch im lebenden Organismus vermitteln.

6.7 Oligodendrocytenreifung *in vivo*

Die Konzentration von NP im Gewässer ist heterogen. In China lassen sich Konzentrationen von bis zu 32,8 $\mu\text{g/L}$ (= 148,85 nM) finden (Wu *et al.*, 2007), in Deutschland sind Werte von 0,13 $\mu\text{g/L}$ – 1,22 $\mu\text{g/L}$ (= 0,6 nM - 5,5 nM) gemessen worden (Bester *et al.*, 2001; Fries & Puttmann, 2003). Aus diesem Grund wurden für die Experimente an Zebrafischen zunächst zwei verschiedene Konzentrationen von 1 nM und 1 μM NP veranschlagt, um das toxische Potential anhand morphologischer Parameter abzuschätzen. Der nanomolare Bereich stellt dabei eine physiologische Konzentration vieler Gewässer dar, der mikromolare Bereich wurde einer Studie entlehnt, bei der bereits Effekte von NP auf das ZNS nachgewiesen wurden (Chandrasekar *et al.*, 2011). Hier zeigten sich Konzentrationen von über 2 μM als toxisch. In einer anderen Studie wurde die letale Dosis (LD50) mit ca. 1600 $\mu\text{g/L}$ (7,26 μM) angegeben. Diese unterscheidet sich jedoch von Fischart zu Fischart (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 2000). Die Ergebnisse aus 5.8.1 lassen darauf schließen, dass die höhere Dosis von 1 μM NP auf Zebrafische zwar nicht letal war, jedoch mit der Ausprägung eines Phänotyps einherging. Eine große Anzahl an Fischen war ventral um die Körperachse gebogen, so dass sie sich nicht mehr adäquat fortbewegen konnte. Zusätzlich schlüpfen die Fische später aus der Eihülle, was auf eine verzögerte Entwicklung, verringerte motorische Aktivität oder verändertes Verhalten schließen lässt.

In einer Studie von Ali und Legler, welche Zebrafischembryos mit NP-Konzentrationen von 0,1-10 μM behandelten, wurden ähnliche morphologische Anomalitäten festgestellt (Ali & Legler, 2011). Das Rückenmark der Fische war ab einer Konzentration von 1 μM gekrümmt und sie schlüpfen ebenfalls später aus dem Ei. Außerdem wurden hier Ödeme und Nekrosen des Dottersacks und der Augen festgestellt. In einer anderen Studie führten schon nanomolare

Konzentrationen von NP zu Änderungen der Körperlänge, des Kopfes und des Herzbeutels (Kinch *et al.*, 2016).

Im Gegensatz dazu konnten Chandrasekar keine verzögerte oder gestörte Entwicklung bei Inkubation der Zebrafischlarven mit 1 μM NP, sondern erst ab 2 μM feststellen. Hier zeigten sich Knoten und Hernien in der Nähe des Rückenmarks, was mit einer fehlerhaften Differenzierung der Rückenmarkszellen einherging (Chandrasekar *et al.*, 2011). Da aufgrund der großen Anzahl von Fischen, die in vorliegender Arbeit einen auffälligen Phänotyp nach einer Behandlung mit 1 μM NP aufwiesen, nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei morphologischen Änderungen um toxische Effekte der NP handelte, wurde für alle weiteren Versuche mit einer Maximalkonzentration vom 500 nM gearbeitet.

Die Ergebnisse mit OPCs und reifen Oligodendrocyten haben gezeigt, dass eine Behandlung der Zebrafische über vier Tage mit NP zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl Olig2- bzw. CldnK-positiver Zellen ab einem höheren Konzentrationsbereich führte. Die Anzahl positiver Zellen bezog sich hierbei auf dorsal migrierende Zellen des Rückenmarks, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich tatsächlich um Oligodendrocyten handelte. Die Frage, ob dieser signifikante Effekt proliferativen oder migrativen Ursprungs ist, kann hierbei nicht abschließend geklärt werden. OPCs migrieren in Richtung der Axone, bevor sie sich in Oligodendrocyten differenzieren. Der Mechanismus, welcher die Ablösung aus der pMN-Region bewirkt, ist weitestgehend unbekannt. Jedoch scheinen miRNAs hierbei eine wichtige Rolle zu spielen, da beispielsweise miRNA219 defiziente Vorläuferzellen für eine unangemessen lange Zeit proliferativ bleiben (Hudish *et al.*, 2013). Eine Aktivierung von Notch1a lässt die pMN Region in einer proliferativen Phase verbleiben, was zu exzessiven Oligodendrocyten-Vorläufern führt (Park & Appel, 2003). Die Hemmung von F-Box and WD repeat domain-containing 7 (Fbxw7), einem Bestandteil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der für die kontrollierte Degradation wichtiger Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren zuständig ist, führt ebenfalls zur exzessiven Freisetzung von unreifen Oligodendrocyten aus der pMN-Region (Snyder *et al.*, 2012). In einer Studie von Park *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Olig2 die verstärkte Bildung von Motoneuronen und Oligodendrocyten zur Folge hatte (Park *et al.*, 2002). Nicht zuletzt ist bekannt, dass das generelle dynamische Verhalten der OPCs und die Fähigkeit, zu reifen Oligodendrocyten zu differenzieren, einem konservierten Mechanismus unterliegen. Wenn die forschenden Zellfortsätze verschiedener OPCs in Kontakt zueinander kommen, so ziehen sich die OPCs voneinander zurück. Bei Zellablation teilen sich benachbarte OPCs, um die Zellzahl

wieder zu erhöhen und anschließend das gleiche explorative Verhalten zu zeigen, was darauf schließen lässt, dass abstoßende Interaktionen dazu führen, die Zellzahl und Position von OPCs im Rückenmark konstant zu halten (Kirby *et al.*, 2006).

In einer Studie aus dem Jahre 2010 konnte gezeigt werden, dass die Exposition eines Steroid-Vorläufers die Anzahl Olig2-positiver Zellen um 25 % steigerte (Buckley *et al.*, 2010). Die Majorität früher Rückenmark-OPCs entwickelt sich dann zu reifen, myelinisierenden Oligodendrocyten (Czopka *et al.*, 2013). Live-Imaging-Studien in Zebrafischen zeigten, dass eine Stilllegung von Neurofibromin1 Genen dazu führt, dass OPCs stark proliferieren und sich deren Pausierungszeiten während der Migration verringern (Lee *et al.*, 2010). Nichtsdestotrotz hatte dies keine verstärkte Myelinisierung des ZNS zur Folge, was zeigt, dass die Anwesenheit von mehr OPCs nicht notwendigerweise in frühreifer oder ektopischer ZNS-Myelinisierung resultiert (Shin *et al.*, 2012). Weiterhin proklamieren einige Studien gar, dass Steroidhormone an der Remyelinisierung von Axonen beteiligt sein könnten (Bruce *et al.*, 2010).

Da es sich in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung der Auswirkung von NP auf Olig2 und CldnK lediglich um deskriptive Beobachtungen handelt, kann über mögliche Signalwege und Mechanismen, die zu mehr dorsalen OPCs führten, lediglich spekuliert werden. Dennoch zeigte sich, dass sich nicht nur die Anzahl unreifer, sondern auch reifer Oligodendrocyten durch die Exposition mit der EU-Fokuschemikalie deutlich erhöhte. Studien in Säugetieren haben verschiedene Schlüssel-Transkriptionsfaktoren wie Sox10, Olig1 und Myrf identifiziert, welche die Differenzierung von OPCs in reife Oligodendrocyten kontrollieren (Mitew *et al.*, 2014). Timelapse Aufnahmen in Zebrafischen zeigten, dass Sox10-mutierte Oligodendrocyten beginnen, sich um Axone zu wickeln, bevor sie dann in Apoptose gehen (Takada *et al.*, 2010). Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des kanonischen Wnt-Signalwegs sind ebenfalls bei der Differenzierung von Oligodendrocyten involviert. Einige Studien in Säugetieren deuten darauf hin, dass die Aktivierung von β -Catenin die Oligodendrocytendifferenzierung negativ reguliert (Fancy *et al.*, 2009). Die Behandlung von Zebrafischen mit Substanzen, welche β -Catenin stabilisieren (also die Aktivierung des Wnt-Signalweges simulieren), unterbrechen ebenfalls die Differenzierung zu reifen Oligodendrocyten (Kim *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Tawk *et al.*, dass eine Reduktion des β -Catenin-Signals die Genexpression des Myelins reprimiert (Tawk *et al.*, 2011). Diese Aspekte sind besonders interessant, da eine koreanische Arbeitsgruppe herausgefunden hat, dass unter dem Einfluss von NP verschiedene miRNAs, welche sowohl

Sox, als auch Wnt-Signalwege regulieren, unter NP verändert exprimiert sind (Choi *et al.*, 2011). MiRNA135a, welche als Zielgene unter anderem den Wnt/ β -Catenin Signalweg aufweist, war in dieser Studie unter NP deutlich herauf reguliert. Dies könnte bedeuten, dass Gene des Wnt- β -Catenin durch erhöhte Mengen dieser miRNA herunter reguliert sind. Die Oligodendrocytendifferenzierung könnte also verstärkt ablaufen, was den beobachteten Effekt auf CldnK erklären würde.

Eine Studie von Chandrasekhar konnte zeigen, dass in Zebrafischen drei Formen des ER vorkommen, die als ER α , ER β und ER β 2 bezeichnet werden (Chandrasekar *et al.*, 2010). Diese werden vorwiegend während der frühen embryonalen Entwicklung des Zebrafischs exprimiert und konnten durch Exposition mit E2 und 4-NP reguliert werden. Die zwei ER β -Gene haben dabei unterschiedliche Expressionslevel, abhängig von ihrem Gewebekontext, so dass ihnen paraloge Funktionen zugeschrieben werden. Eine Inkubation von Zebrafischen über drei Tage mit östrogenen Liganden (E2, 4-NP) erhöhte die Expression der Gene, was darauf schließen lässt, dass sie unter regulatorischer Kontrolle stehen. NP agierten dabei sowohl als Agonisten, als auch als Antagonisten der ER während der Entwicklung.

Genauso wie Okada *et al.* bei neuronalen Vorläuferzellen aus Ratten eine Östrogen-vermittelte Verstärkung der Zellteilung durch NP beobachtet haben (Okada *et al.*, 2010), bringt auch eine Arbeitsgruppe um Vosges *et al.* die verstärkte Proliferation von GnRH-Neuronen im Vorderhirn von Zebrafischen in Zusammenhang mit der östrogenen Wirkung von NP (Vosges *et al.*, 2012). Sie konnte zeigen, dass die siebentägige Exposition von Zebrafischlarven mit EE2 in einer erhöhten Anzahl von GnRH-ir Neuronen konvergiert und dass NP konzentrationsabhängig in der Lage war, ähnliche Effekte zu vermitteln. Durch ICI 182,780 konnte die verstärkte Proliferation sowohl im Falle des EE2 als auch NP unterbunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die erhöhte Zellteilungsrate im Rückenmark von 4 dpf Zebrafischlarven durch die immunohistologische Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA nachgewiesen. Es handelt sich hier also vermutlich um verstärkte Proliferation und weniger Migration. Eine erhöhte Anzahl von unreifen OPCs führt sodann zu einer erhöhten Anzahl reifer Oligodendrocyten.

Es stellt sich also die Frage, welche Auswirkungen eine verstärkte Reifung von Oligodendrocyten durch NP-Exposition auf das ZNS haben kann. Die zielführende Myelinisierung der Axone ist für die Funktion des Nervensystems essentiell. Neue Studien konnten beweisen, dass eine falsche Myelinisierung von Zellkörpern und Dendriten statt

Axonen am häufigsten dann auftritt, wenn das Angebot an reifen Oligodendrocyten und Myelin den axonalen Bedarf übertrifft. Die falsche Myelinisierung von Zellkörpern fand in Zebrafisch-Mutanten statt, die weniger Axone hatten oder, unabhängig davon, wenn Fische mit einer Substanz behandelt wurden, welche die Anzahl reifer Oligodendrocyten erhöhte (Almeida *et al.*, 2018). Die Autoren wiederholten ihre Versuche an Säugetieren, indem sie den Akt1 Signalweg myelinisierender Oligodendrocyten in Mäusen förderten, was zu einer größeren Anzahl reifer Oligodendrocyten führt. Über eine Immunfluoreszenz gegen MBP (myelin basic protein) und NeuN (Neuronal Nuclei) von Cervix-Rückenmarksschnitten an P30 Mäusen zeigte sich, dass die Anzahl NeuN-positiver neuronaler Zellkörper, die von MBP-positiven Zellen umwickelt waren, deutlich erhöht war. Eine Imbalance von Myelin-Angebot und axonalem Myelin-Bedarf kann also auch bei Säugetieren zu fehlerhafter Myelinisierung führen. Pathologische Änderungen in Oligodendrocyten wurden beispielsweise sowohl nach BPA-Behandlung als auch in Patienten mit Schizophrenie beobachtet. Dabei waren die Differenzierung der Oligodendrocyten sowie die Expression von Myelin-Proteinen verändert (Brown, 2009). Eine solche Auswirkung wäre auch bei langfristiger NP-Exposition denkbar.

6.8 Zusammenfassende Bewertung und Relevanz

Nicht nur im embryonalen, sondern auch im adulten Gehirn findet Neurogenese statt. Das alternde Gehirn behält die Fähigkeit, den fortschreitenden Verlust von synaptischen Verbindungen zu kompensieren, jedoch ist dies nur in sogenannten neurogenen Nischen möglich. Die Neuronen entstehen dabei aus einer Population multipotenter, neuraler Stammzellen und können in verschiedene Gebiete des Gehirns migrieren und sich dort der neuen Mikroumwelt anpassen. Neurogene Nischen, in denen adulte Neurogenese beobachtet wurde, sind die subventrikuläre Zone (SVZ) und die subgranuläre Zone (SGZ), die ein Teil des DG und des Hippocampus ist (Weiss, 2007). Neurogenese und Synaptogenese gehen dabei Hand in Hand und unterliegen der Wirkung von Hormonen. Auch wenn die Proliferation von Neuronen im Alter marginal sein sollte, so kann sie doch helfen, den Verlust an funktionaler Gehirnkapazität im Alter zu kompensieren bzw. zu minimieren. Bei der Risikobewertung für die Alterung des Gehirns müssen somit auch EDCs wie NP in Zukunft mit einberechnet werden. Die Forschung konzentrierte sich in den letzten Jahren jedoch eher auf die perinatale Entwicklung und weniger auf die Korrelation von EDCs und deren Effekte auf die adulte Neurogenese. Somit ist die Datenlage eher spekulativ, was damit zusammenhängen kann, dass NP und andere EDCs immer noch als schwache Östrogen-

ähnliche Substanzen angesehen werden, die in der Umwelt in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. Dabei gilt es mittlerweile als bewiesen, dass die Konzentrationen von NP in Geweben um ein 10- bis 100-faches höher liegen als die in der Umwelt gemessenen. Die Akkumulation von vielen EDCs in lipophilen Kompartimenten, die synergistischen Effekte und eine Langzeitexposition über die gesamte Lebensspanne wurde bislang jedoch noch nicht untersucht. Weiterhin wird proklamiert, dass bislang noch keine Effekte auf die menschliche Population beobachtet wurden und sich somit die Frage nach der Relevanz für unsere Lebenswirklichkeit stellt. Eine einzige epidemiologische Studie mit hoher Fallzahl aus dem Jahre 2011 sammelte 17.000 Fälle aus Patientenakten in Spanien und Andalusien. Sie wiesen eine Assoziation zwischen der Inzidenz neurodegenerativer Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose) und der Exposition mit Pestiziden nach (Parrón *et al.*, 2011). Auch PCB wurden mit einer Unterbrechung des dopaminergen Systems in Verbindung gebracht, *post mortem* Studien zeigten eine starke Korrelation hoher PCB-Konzentrationen und dem Auftreten von Parkinson-bezogenen Pathologien, besonders bei Frauen (Hatcher-Martin *et al.*, 2012). Für andere EDCs fehlt weiterhin epidemiologische Evidenz beim Menschen. Bezüglich dessen wird von Kritikern immer wieder darauf hingewiesen, dass in Tierstudien Konzentrationsbereiche und zeitliche Abläufe appliziert werden, die keine reale Umweltexposition simulieren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch eindrücklich gezeigt werden, dass Konzentrationen im sehr geringen nanomolaren Bereich *in vitro* bereits zu negativen Auswirkungen auf das Auswachsen von Neuriten in Zelllinie und Primärzellen sowie zu einer signifikanten Reduktion der synaptischen Dichte geführt haben. Die hier eingesetzten Konzentrationen von 0,05 bis 10 nM sind daneben so gering, dass die häufig angeführte Kritik, die Chemikalie habe auch nicht-östrogene, toxische Nebeneffekte, welche eine Verallgemeinerung der tatsächlichen xenoöstrogenen Wirkung beeinträchtigt, konterkariert. Auch im Zebrafischmodell eingesetzte Konzentrationen lagen im nanomolaren Bereich und wurden lediglich für vier Tage appliziert, was die Auswirkungen einer Langzeitexposition unterschätzen könnte. Es darf daneben nicht außer Acht gelassen werden, dass die Grundlagen der synaptischen Plastizität und Neurogenese im Alter noch immer nicht vollständig geklärt sind und sich somit auch die Frage nach der Sensitivität der Analysemethoden stellt. Die Langzeitexposition mit EDCs schließt auch epigenetische Veränderungen mit ein. Diese können auf Histonmodifikationen, DNA-Methylierungen und der Expression nicht-kodierender RNA (einschließlich miRNAs) beruhen. Verschiedene Studien der letzten Jahre zeigen Evidenz, dass *in utero* Expositionen mit Umweltchemikalien Änderungen der Genexpression induzieren können, die ein Leben lang anhalten (Singh & Li,

2012). NP war beispielsweise in der Lage, das Histon H2AX zu phosphorylieren (Toyooka *et al.*, 2012), die Histone 3 und 4 des TNFA- (Tumor-Nekrose-Faktor- α) Genlokus zu acetylieren und CpG-Inseln zu stimulieren (Hung *et al.*, 2013). All diese Modifikationen ziehen langfristige Änderungen der Transkription nach sich. Somit könnte die Basis für neurologische Erkrankungen im Alter in der epigenetischen Modifikation während der fötalen Entwicklung liegen.

Letztendlich stellt sich also die Frage, inwieweit die Verzögerungen der neuronalen Entwicklung und Inhibition der Differenzierung auch zu Konsequenzen für die menschliche Gesundheit werden können. Krankheiten des Nervensystems sowie psychische Störungen und Verhaltensstörungen sind eine der großen Herausforderungen für unsere Gesellschaft, da sie das Gesundheitssystem durch immense Kosten belasten. In Deutschland verursachen neurologische Erkrankungen jährlich Kosten von mehr als 88 Milliarden Euro (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2018). Einige Erkrankungen, zu denen beispielsweise Autismus, Schizophrenie und die bipolare Störung zählen, sind auf Störungen während der Entwicklung des Nervensystems zurückzuführen. Bislang ist dem Einfluss der endokrinen Funktion auf die Neurogenese zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden, obschon einige Prozesse bekannt sind, die auf der Wirkung endogener Hormone beruhen. Die Wirkungen des natürlichen Östrogens können dabei bestenfalls als pleiotrop bezeichnet werden und hängen stark von Alter und Geschlecht der untersuchten Probanden ab (Galea *et al.*, 2017). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Proliferation, Differenzierung und Migration sowie Synaptogenese und indirekt auch Myelinisierung sensitiv auf den endokrinen Disruptor NP reagieren. Dieser Mechanismus wird, wie bereits hinlänglich diskutiert, auf die Fähigkeit des NP zurückgeführt, die Bindung des natürlichen Östrogen-Hormons an seinen Rezeptor nachzuahmen, zu agonisieren oder zu antagonisieren. Mäuse, die zu wenig ER β aufweisen, zeigen Anzeichen verringerter synaptischer Plastizität und Neurogenese (Day *et al.*, 2005). Eine zu geringe ER α mRNA-Expression wurde im Hippocampus betroffener Individuen mit Schizophrenie und Alzheimer in Zusammenhang gebracht (Perlman *et al.*, 2005). Zusätzlich gibt es Studien, welche die Einflussnahme der ER in der Modulation von Symptomen bei Depression beschreiben (Crews, 2010).

In Tierstudien können bereits jetzt neurologische Entwicklungsstörungen wie Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrome (ADHS) mit NP-Exposition in frühen Lebensphasen korreliert werden. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen NP und motorischer Hyperaktivität wurde von Masuo *et al.* nach intrazisternaler Verabreichung

(8,7 mM) bei fünf Tage alten männlichen Ratten nachgewiesen. Unerwünschte Wirkungen auf das sich entwickelnde Gehirn, die ein Defizit an dopaminergen Neuronen hervorrufen und zu motorischer Hyperaktivität führen, wurden von diesem Autor im Alter von vier Wochen beobachtet (Masuo *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigte eine Verabreichung von endokrinen Disruptoren einschließlich NP auch bei Ishido *et al.* bei fünf Tage alten männlichen Wistar Ratten im Alter von vier bis fünf Wochen eine signifikante Hyperaktivität. Die Genexpression des G-Protein gekoppelten Rezeptors, welcher in die Neurotransduktion involviert ist, war dabei um das 2,8-fache erhöht (Ishido *et al.*, 2005).

In einer Studie von Yu *et al.* wurden die Konzentrationen von NP in Urin und Blut von Patienten mit klinisch diagnostiziertem ADHS mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen (Yu *et al.*, 2016). Die NP-Konzentrationen lagen in beiden Gruppen im Schnitt bei 1,6 µg/dL (Blutserum) bzw. 4,5 µg/g Kreatinin (Urin). Auch nach Adjustierung der Kovarianten ergab sich keine Korrelation zwischen Auftreten eines ADHS und dem NP-Gehalt in Blut und Urin.

Wird die Datenlage der NP in Bezug auf deren Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems als Ganzes betrachtet, so fällt auf, dass eine Evidenz für die NP-bedingten endokrinen Störungen und die Folgen für die Nervenfunktion dennoch immer wahrscheinlicher wird. Sofern es eine kausale Assoziation gibt, so muss sie politische und gesellschaftliche Konsequenzen nach sich ziehen, was ein vollständiges Verbot des Einsatzes und der Einfuhr von NP bedeuten könnte. Hierbei ist es besonders wichtig, dass die NP unter einem Isomer-spezifischen Gesichtspunkt analysiert werden. Neurotoxizität ist ein lebenslanges Thema, welches nicht nur auf die frühen Phasen der Entwicklung bezogen werden darf. Die Studien der letzten Jahrzehnte zeigen auf, dass wir noch viel zu wenig über das sensible Gleichgewicht zwischen Gehirnentwicklung, Hormonsystem, Gehirnalterung und EDCs wissen. Das Bestreben nach Aufklärung der unterliegenden molekularen Mechanismen darf nicht nachlassen, bis eine konkrete Gefahr der NP und seiner Derivate vollständig ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund müssen weitere funktionelle Untersuchungen in umweltrelevanten Konzentrationen und Experimente zur Wirkung der einzelnen Isomere folgen. Abbildung 27 fasst die Expositions- und Signalwege sowie die Auswirkungen der NP abschließend zusammen.

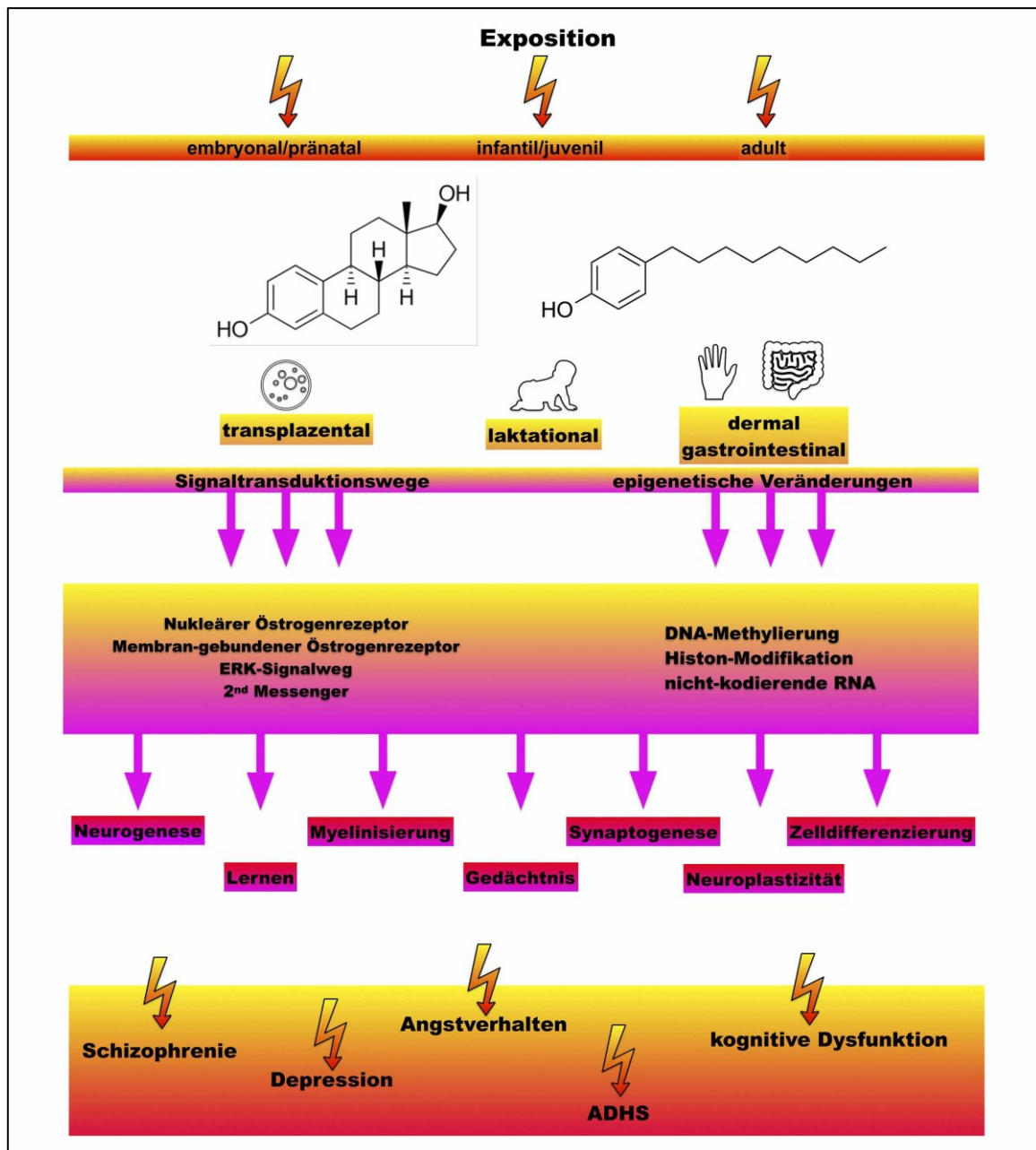


Abbildung 27: Die Interferenz von NP mit E2 führt zu Veränderungen im Nervensystem (eigene Darstellung)

Die Exposition des Menschen mit NP über die gesamte Lebensspanne führt zu einer Veränderung verschiedener Transkriptionswege und langfristig ggf. zu epigenetischen Modifikationen. Folge der Wirkungen von NP als EDC können kognitive Beeinträchtigungen und Verhaltensänderungen sein.

7 Ausblick

Zur weiteren Charakterisierung der Auswirkungen von NP scheint es sinnvoll zu sein, zunächst einzelne NP-Isomere zu synthetisieren oder aus dem technischen Gemisch zu isolieren. Der Analyse per Gaschromatographie und Massenspektrometrie sollte dann ein systematisches Screening der Einzelsubstanzen folgen, wie es bislang wegweisend nur bei Dioxinen geschehen ist. Noch nicht identifizierte Isomere oder Minorkomponenten im technischen NP-Gemisch könnten unterschiedliche Signalwege anstoßen und Wirkungen vermitteln, welche so bislang noch nicht untersucht wurden. Im Bereich der Grundlagenforschung wären Co-Lokalisierungsstudien von prä- und postsynaptischen Markern sinnvoll, um Aussagen über Effekte der NP auf Ebene von einzelnen Synapsen treffen zu können. Außerdem lässt die Anwendung eines GPR30-Inhibitors oder anderer Komponenten des NP-Signalwegs Rückschlüsse auf Wirkungskaskaden zu.

Der Zebrafisch bietet sich daneben an, um in Verhaltenstests funktionelle Auswirkungen einer NP-Exposition nachzuweisen. Der so genannte Stellreflex kann durch Vibrationsimpulse nach 4 dpf ausgelöst werden und ist bei Verzögerungen oder Störungen der Entwicklung nicht voll entwickelt. Ein Experiment zur funktionellen Analyse auf Zellebene könnte der Nachweis falsch myelinisierter Zellkörper darstellen. Durch einen spezifischen neuronalen Marker wie NeuN in Kombination mit der transgenen Zebrafischlinie Mbp:egfp-CAAX (CAAX-Box) könnte verstärkte Myelinisierung nicht-axonaler Bereiche durch reife Oligodendrocyten sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis gäbe Aufschluss über Myelinisierungsdefekte im lebenden Organismus.

Auch wenn der Zebrafisch ein gutes Modell zur Testung kognitiver Dissonanzen darstellt, sollten die Effekte der NP auf die Entwicklung des Nervensystems zusätzlich in einem anderen *in vivo* Modell verifiziert werden. Hier könnte sich beispielsweise die Futtersupplementierung von Nagetieren zur Überprüfung von Langzeitwirkungen anbieten. Insgesamt sollte eine stärkere Fokussierung auf Spätschäden und epigenetische Veränderungen gelegt werden. Ein ADI-Wert für NP ist bislang nicht definiert, lediglich eine tägliche Aufnahme von 15 mg/kg gilt als Dosis ohne Effekt. Hier ist eine Anreicherung in fettreichen Geweben jedoch nicht mitberücksichtigt. Weitere Untersuchungen der NP könnten zu einer Anpassung der Grenzwerte führen und sind dringend notwendig.

8 Zusammenfassung

Bei Nonylphenolen handelt es sich um eine Gruppe chemischer Verbindungen mit aromatischem Ring, Hydroxylgruppe und einer Nonyl-Seitenkette, die entweder verzweigt oder linear vorliegen kann. Das technische, das heißt im industriellen Prozess hergestellte, Nonylphenol besteht aus einer Mischung verschiedener Konstitutionsisomere und Enantiomere und dient als Vorläuferprodukt der Nonylphenoethoxylate. Wegen ihrer guten Tensidwirkungen finden Nonylphenoethoxylate Einsatz als nicht-ionische, grenzflächenaktive Substanzen in Wasch- und Reinigungsmitteln, als Formulierungshilfsstoffe und in Farben und Lacken. In Kläranlagen werden Nonylphenolabkömmlinge dann zu toxischem, persistentem 4-NP abgebaut. Die Chemikalie lässt sich in vielen umweltrelevanten Matrices wie Gewässern, Sedimenten und Flüssen finden und ubiquitär in Lebensmitteln nachweisen. Somit wurden Nonylphenole auch in relativ hohen Konzentrationen in verschiedenen menschlichen Geweben detektiert. Über Haut, Atemorgane und den Magen-Darm-Trakt wird eine tägliche Aufnahme von circa 7,5 µg/Tag bei Erwachsenen und bis zu 1,4 µg/Tag bei Säuglingen postuliert. Nonylphenol ist dabei plazentagängig und kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Durch seine Struktur akkumuliert es zudem leicht in lipophilen Kompartimenten des Körpers. Besonders hohe Konzentrationen wurden aus diesem Grund im Fettgewebe detektiert, doch auch das Nabelschnurblut, die Plazenta, die Muttermilch und das Gehirn selbst weisen Spuren von Nonylphenolen im nanomolaren Bereich auf. Seit den 1990er Jahren ist bekannt, dass Nonylphenole der Gruppe endokriner Disruptoren zuzuordnen sind. Jene sind in der Lage das natürliche Hormon 17β-Östradiol von seinem Rezeptor zu verdrängen und ihn somit kompetitiv zu hemmen oder zu transaktivieren. Durch die xenobiotische Wirkung ahmt die Chemikalie natürliche Effekte des Östradiols nach und führt zu nachweisbaren Störungen des endokrinen Systems und der sexuellen Reifung verschiedener Organismen. Dabei vermittelt es seine Wirkungen sowohl über die klassischen Östrogenrezeptoren als auch über den membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR30. Neben den bekannten Wirkungen von Nonylphenolen als endokriner Disruptor sind auch Effekte auf das Nervensystem bekannt. Die Chemikalie vermittelt *in vitro* neurotoxische Wirkungen auf verschiedene neuronale Zelltypen, hemmt das Auswachsen von Nervenzellen und die Proliferation neuraler Stammzellen. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass ein technisches Nonylphenol-Gemisch in einem Konzentrationsbereich von 0,05 nM bis 1 µM keine toxischen Effekte auf Neuroblastomzellen der Linie B35 ausübt. Jedoch inhibiert eine

Inkubation mit der Chemikalie signifikant die durchschnittliche Länge von Zellausläufern in B35-Zellen sowie in Primärzellen des Kleinhirns aus der Maus. Dieser Effekt ist vermutlich partiell auf die reduzierte Signaltransduktion der ERK1/2 Kinase zurückzuführen, welche stromaufwärts durch Steroide oder hormonähnliche Liganden wie Nonylphenole beeinflusst werden kann. Durch das Xenooestrogen kommt es mutmaßlich zu einer kompetitiven Inhibition des Signalwegs, die weitere zelluläre Modifikationen nach sich zieht. Als Folge einer Nonylphenolbehandlung reagieren Primärzellen mit einer gehemmten Bildung oder Rückbildung Synaptophysin-haltiger Vesikel, was in einer verringerten synaptischen Plastizität konvergieren könnte. Weiterhin ändert sich unter Einfluss der Chemikalie die Verteilung von Aktin und Tubulin innerhalb der B35-Zellen, deren Proliferation sowie deren Adhäsions- und Migrationsverhalten. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die isolierten Nonylphenolisomere NP65, NP111 und NP112 das Auswachsen von B35-Zellausläufern in unterschiedlicher Weise beeinflussten. Während die Isomere NP65 und NP111 dosisabhängig zu einer Verkürzung der Neuriten führten, zeigte das Isomer NP112 keinen Effekt. In Zebrafischen führt eine Applikation des technischen NP-Gemisches in das Fischwasser zu einer verstärkten Bildung oder Migration unreifer Oligodendrocyten-Vorläuferzellen und reifer Oligodendrocyten. Zudem wurde in Sagittalschnitten der Zebrafischlarven eine erhöhte Proliferation und Apoptose im Rückenmark der Fische nachgewiesen. Durch erhöhte Migration oder fehlerhafte Differenzierung von myelinisierenden Oligodendrogliazellen kann es zu verstärkter Myelinisierung von Zellkörpern kommen. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass Nonylphenole fundamentale Prozesse der Zelldifferenzierung und neuronaler Vorgänge in verschiedenen Zellsystemen und Organismen ändern und somit einen negativen Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems und die synaptische Plastizität hervorrufen können.

9 Referenzen

- Acir, I.-H. & Guenther, K.** (2018) Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates - A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *The Science of the total environment*, **635**, 1530–1546.
- Acir, I.-H., Wust, M. & Guenther, K.** (2016) Enantioselective separation of defined endocrine-disrupting nonylphenol isomers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **408**, 5601–5607.
- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F. & Funari, E.** (2008) Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment international*, **34**, 984–987.
- Ahel, M. & Giger, W.** (1993) Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere*, **26**, 1461–1470.
- Ali, T.E.-S. & Legler, J.** (2011) Developmental toxicity of nonylphenol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Indian Journal of Marine Sciences*, 509–515.
- Almeida, R.G., Pan, S., Cole, K.L.H., Williamson, J.M., Early, J.J., Czopka, T., Klingseisen, A., Chan, J.R. & Lyons, D.A.** (2018) Myelination of Neuronal Cell Bodies when Myelin Supply Exceeds Axonal Demand. *Current biology*, **28**, 1296-1305.
- Amatruda, J.F. & Patton, E.E.** (2008) Genetic models of cancer in zebrafish. *International review of cell and molecular biology*, **271**, 1–34.
- Aoki, M., Kurasaki, M., Saito, T., Seki, S., Hosokawa, T., Takahashi, Y., Fujita, H. & Iwakuma, T.** (2004) Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life sciences*, **74**, 2301–2312.
- Araujo, F.G.D., Bauerfeldt, G.F. & Cid, Y.P.** (2017) Nonylphenol. Properties, legislation, toxicity and determination. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **90**, 1-16.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L. & Katzenellenbogen, B.S.** (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 8517–8521.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A. & Cravedi, J.-P.** (2000) In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, **49**, 289–304.
- Balakrishnan, B., Thorstensen, E., Ponnampalam, A. & Mitchell, M.D.** (2011) Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*, **32**, 788–792.
- Basheer, C., Lee, H.K. & Tan, K.S.** (2004) Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine pollution bulletin*, **48**, 1161–1167.
- Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft** (2000) Untersuchungen zur endokrinen und toxischen Wirkung von Nonylphenol auf Fische. Teilbericht I zum Forschungsvorhaben 77e040100.
- Beeler, T.J. & Gable, K.S.** (1993) Activation of Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum vesicles by 4-alkylphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*, **301**, 216–220.

- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A. & Katzenellenbogen, B.S.** (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 2496–2500.
- Bester, K., Theobald, N. & Schröder, H.F.** (2001) Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere*, **45**, 817–826.
- Bevan, C.L., Porter, D.M., Schumann, C.R., Bryleva, E.Y., Hendershot, T.J., Liu, H., Howard, M.J. & Henderson, L.P.** (2006) The endocrine-disrupting compound, nonylphenol, inhibits neurotrophin-dependent neurite outgrowth. *Endocrinology*, **147**, 4192–4204.
- Bhatt, B.D., Prasad, J.V., G, K. & Ali, S.** (1992) Separation and Characterization of Isomers of p-Nonylphenols by Capillary GC/GC—MS/GC—FTIR Techniques. *Journal of Chromatographic Science*, **30**, 203–210.
- Bisbal, M. & Sanchez, M.** (2019) Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural regeneration research*, **14**, 762–766.
- Blair, R.M.** (2000) The Estrogen Receptor Relative Binding Affinities of 188 Natural and Xenochemicals: Structural Diversity of Ligands. *Toxicological Sciences*, **54**, 138–153.
- Boehme, R.M., Andries, T., Dotz, K.H., Thiele, B. & Guenther, K.** (2010) Synthesis of defined endocrine-disrupting nonylphenol isomers for biological and environmental studies. *Chemosphere*, **80**, 813–821.
- Bonefeld-Jorgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V. & Vinggaard, A.M.** (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental health perspectives*, **115**, 69–76.
- Boulware, M.I., Heisler, J.D. & Frick, K.M.** (2013) The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *The Journal of neuroscience*, **33**, 15184–15194.
- Brown, J.S.** (2009) Effects of bisphenol-A and other endocrine disruptors compared with abnormalities of schizophrenia: an endocrine-disruption theory of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, **35**, 256–278.
- Bruce, C.C., Zhao, C. & Franklin, R.J.M.** (2010) Remyelination - An effective means of neuroprotection. *Hormones and behavior*, **57**, 56–62.
- Brufani, M., Rizzi, N., Meda, C., Filocamo, L., Ceccacci, F., D’Aiuto, V., Bartoli, G., La Bella, A., Migneco, L.M., Bettolo, R.M., Leonelli, F., Ciana, P. & Maggi, A.** (2017) Novel Locally Active Estrogens Accelerate Cutaneous Wound Healing-Part 2. *Scientific reports*, **7**, 1-14.
- Buckley, C.E., Marguerie, A., Roach, A.G., Goldsmith, P., Fleming, A., Alderton, W.K. & Franklin, R.J.M.** (2010) Drug reprofiling using zebrafish identifies novel compounds with potential pro-myelination effects. *Neuropharmacology*, **59**, 149–159.
- Bulayeva, N.N. & Watson, C.S.** (2004) Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environmental health perspectives*, **112**, 1481–1487.

- Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P. & Hernández-Córdoba, M.** (2012) Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, **1241**, 21–27.
- Calafat, A.M., Kuklenyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J. & Needham, L.L.** (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental health perspectives*, **113**, 391–395.
- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S. & Sezenna, E.** (2015) Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food. A review. *Environmental science and pollution research international*, **22**, 5711–5741.
- Carreon, C.** (2017) 4-Nonylphenol Induces Neurodegeneration by Altering Cytoskeleton. ProQuest Dissertations and Theses.
- Chandrasekar, G., Archer, A., Gustafsson, J.-A. & Andersson Lendahl, M.** (2010) Levels of 17beta-estradiol receptors expressed in embryonic and adult zebrafish following in vivo treatment of natural or synthetic ligands. *PloS one*, **5**, e9678.
- Chandrasekar, G., Arner, A., Kitambi, S.S., Dahlman-Wright, K. & Lendahl, M.A.** (2011) Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, **33**, 752–764.
- Chen, G.-W., Ding, W.-H., Ku, H.-Y., Chao, H.-R., Chen, H.-Y., Huang, M.-C. & Wang, S.-L.** (2010) Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. *Food and chemical*, **48**, 1939–1944.
- Chen, M.-L., Chang, C.-C., Shen, Y.-J., Hung, J.-H., Guo, B.-R., Chuang, H.-Y. & Mao, I.-F.** (2008) Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere*, **73**, 239-245.
- Chen, M.-L., Lee, W.-P., Chung, H.-Y., Guo, B.-R. & Mao, I.-F.** (2005) Biomonitoring of alkylphenols exposure for textile and housekeeping workers. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **85**, 335–347.
- Choi, J.-S., Oh, J.-H., Park, H.-J., Choi, M.-S., Park, S.-M., Kang, S.-J., Oh, M.-J., Kim, S.J., Hwang, S.Y. & Yoon, S.** (2011) miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol. *Reproductive biology and endocrinology*, **9**, 2-11.
- Choi, M.-S., Park, H.-J., Oh, J.-H., Lee, E.-H., Park, S.-M. & Yoon, S.** (2014) Nonylphenol-induced apoptotic cell death in mouse TM4 Sertoli cells via the generation of reactive oxygen species and activation of the ERK signaling pathway. *Journal of applied toxicology*, **34**, 628–636.
- Citri, A. & Malenka, R.C.** (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 18–41.
- Couderc, M., Gandar, A., Kamari, A., Allain, Y., Zalouk-Vergnoux, A., Herrenknecht, C., Le Bizec, B., Mouneyrac, C. & Poirier, L.** (2014) Neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol exposure during gestational and breastfeeding period on F1 rats. *Neurotoxicology*, **44**, 237–249.
- Couleau, N., Falla, J., Beillerot, A., Battaglia, E., D’Innocenzo, M., Plançon, S., Laval-Gilly, P. & Bennisroune, A.** (2015) Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PloS one*, **10**, e0131428.

- Crepel, F. & Jaillard, D.** (1991) Pairing of pre- and postsynaptic activities in cerebellar Purkinje cells induces long-term changes in synaptic efficacy in vitro. *The Journal of physiology*, **432**, 123–141.
- Crews, D.** (2010) Epigenetics, brain, behavior, and the environment. *Hormones*, **9**, 41–50.
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C. & Lyons, D.A.** (2013) Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental cell*, **25**, 599–609.
- Day, M., Sung, A., Logue, S., Bowlby, M. & Arias, R.** (2005) Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behavioural brain research*, **164**, 128–131.
- D’Errico, F., Goverse, G., Dai, Y., Wu, W., Stakenborg, M., Labeeuw, E., Simone, V. de, Verstockt, B., Gomez-Pinilla, P.J., Warner, M., Di Leo, A., Matteoli, G. & Gustafsson, J.A.** (2018) Estrogen receptor β controls proliferation of enteric glia and differentiation of neurons in the myenteric plexus after damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 5798–5803.
- Di, Q.-N., Cao, W.-X., Xu, R., Lu, L., Xu, Q. & Wang, X.-B.** (2018) Chronic low-dose exposure of nonylphenol alters energy homeostasis in the reproductive system of female rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **348**, 67–75.
- Diestel, S., Schaefer, D., Cremer, H., Schmitz, B.** (2007) NCAM is ubiquitylated, endocytosed and recycled in neurons. *Journal of Cell Science*, **120**, 4035–49.
- Dodder, N.G., Maruya, K.A., Lee Ferguson, P., Grace, R., Klosterhaus, S., La Guardia, M.J., Lauenstein, G.G. & Ramirez, J.** (2014) Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast and the influence of land use, storm water discharge, and treated wastewater effluent. *Marine pollution bulletin*, **81**, 340–346.
- Dodds, E.C. & Lawson, W.** (1938) Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society of London*, **125**, 222–232.
- Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Chang, H.C., Newbold, R.R. & Delclos, K.B.** (2002) Mass spectrometric determination of p-nonylphenol metabolism and disposition following oral administration to Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology*, **16**, 45–56.
- Europäische Chemikalienagentur (ECHA)** (2014) Committee for Risk Assessment (RAC) Committee for Socio-economic Analysis (SEAC). Background document to the Opinion on the Annex XV dossier proposing restrictions on NONYLPHENOL and NONYLPHENOL ETHOXYLATES.
- Europäische Chemikalienagentur (ECHA)** (2018) Stoffinformation Phenol, 4-nonyl-, branched. Available at: <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.076.631>. Accessed 07.12.18.
- European Union Risk Assessment Report** (2002) 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol.
- Falkenstein, E., Heck, M., Gerdes, D., Grube, D., Christ, M., Weigel, M., Buddhikot, M., Meizel, S. & Wehling, M.** (1999) Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca²⁺-fluxes in sperm. *Endocrinology*, **140**, 5999–6002.
- Fancy, S.P.J., Baranzini, S.E., Zhao, C., Yuk, D.-I., Irvine, K.-A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R.J.M. & Rowitch, D.H.** (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes and development*, **23**, 1571–1585.

- Farré, M., Klöter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., de Alda, M.J.L. & Barceló, D.** (2002) Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Analytica Chimica Acta*, **456**, 19–30.
- Fernandez, S.M., Lewis, M.C., Pechenino, A.S., Harburger, L.L., Orr, P.T., Gresack, J.E., Schafe, G.E. & Frick, K.M.** (2008) Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *The journal of neuroscience*, **28**, 8660–8667.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F. & Funari, E.** (2008) Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere*, **72**, 1279–1285.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Orru, M.A., Silvestroni, L. & Funari, E.** (2011) Alkylphenols in adipose tissues of Italian population. *Chemosphere*, **82**, 1044–1049.
- Findley, M.K. & Koval, M.** (2009) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB life*, **61**, 431–437.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J. & Radulovic, J.** (2004) Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *The Journal of neuroscience*, **24**, 1962–1966.
- Flynn, K.M., Newbold, R.R. & Ferguson, S.A.** (2002) Multigenerational exposure to dietary nonylphenol has no severe effects on spatial learning in female rats. *Neurotoxicology*, **23**, 87–94.
- Fortress, A.M., Fan, L., Orr, P.T., Zhao, Z. & Frick, K.M.** (2013) Estradiol-induced object recognition memory consolidation is dependent on activation of mTOR signaling in the dorsal hippocampus. *Learning & memory*, **20**, 147–155.
- Fraser, T.W.K., Khezri, A., Lewandowska-Sabat, A.M., Henry, T. & Ropstad, E.** (2017) Endocrine disruptors affect larval zebrafish behavior. Testing potential mechanisms and comparisons of behavioral sensitivity to alternative biomarkers. *Aquatic toxicology*, **193**, 128–135.
- Fries, E. & Puttmann, W.** (2003) Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *Journal of Environmental Monitoring*, **5**, 598–603.
- Frye, C.A., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessi-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Le Page, Y., Patisaul, H.B., Venerosi, A., Wojtowicz, A.K. & Panzica, G.C.** (2012) Endocrine disruptors. A review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology*, **24**, 144–159.
- Gabriel, F.L.P., Cyris, M., Jonkers, N., Giger, W., Guenther, K. & Kohler, H.-P.E.** (2007) Elucidation of the ipso-substitution mechanism for side-chain cleavage of alpha-quaternary 4-nonylphenols and 4-t-butoxyphenol in *Sphingobium xenophagum* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 3320–3326.
- Gabriel, F.L.P., Giger, W., Guenther, K. & Kohler, H.-P.E.** (2005) Differential Degradation of Nonylphenol Isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1123–1129.
- Gabriel, F.L.P., Routledge, E.J., Heidlberger, A., Rentsch, D., Guenther, K., Giger, W., Sumpter, J.P. & Kohler, H.-P.E.** (2008) Isomer-Specific Degradation and Endocrine Disrupting Activity of Nonylphenols. *Environmental Science & Technology*, **42**, 6399–6408.
- Galea, L.A.M., Frick, K.M., Hampson, E., Sohrabji, F. & Choleris, E.** (2017) Why estrogens matter for behavior and brain health. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **76**, 363–379.

- Ganzinger, K.A. & Schulle, P.** (2019) More from less - bottom-up reconstitution of cell biology. *Journal of Cell Science*, **132**.
- Geens, T., Neels, H. & Covaci, A.** (2012) Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*, **87**, 796–802.
- Ghisari, M. & Bonefeld-Jorgensen, E.C.** (2005) Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Molecular and cellular endocrinology*, **244**, 31–41.
- Giger, W., Stephanou, E. & Schaffner, C.** (1981) Persistent organic chemicals in sewage effluents: Identifications of nonylphenols and nonylphenoxyethoxylates by glass capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Chemosphere*, **10**, 1253–1263.
- Gray, M.A. & Metcalfe, C.D.** (1997) Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental toxicology and chemistry*, **16**, 1082–1086.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H. & Raecker, T.** (2002) Endocrine Disrupting Nonylphenols Are Ubiquitous in Food. *Environmental Science & Technology*, **36**, 1676–1680.
- Guenther, K., Kleist, E. & Thiele, B.** (2006) Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **384**, 542–546.
- Guenther, K., Raecker, T. & Boehme, R.** (2017) An Isomer-Specific Approach to Endocrine-Disrupting Nonylphenol in Infant Food. *Journal of agricultural and food chemistry*, **65**, 1247–1254.
- Gutendorf, B. & Westendorf, J.** (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, **166**, 79–89.
- Gyllenhammar, I., Glynn, A., Darnerud, P.O., Lignell, S., van Delft, R. & Aune, M.** (2012) 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environment international*, **43**, 21–28.
- Haffter, P. & Nuesslein-Volhard, C.** (1996) Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *The International journal of developmental biology*, **40**, 221–227.
- Hatcher-Martin, J.M., Gearing, M., Steenland, K., Levey, A.I., Miller, G.W. & Pennell, K.D.** (2012) Association between polychlorinated biphenyls and Parkinson's disease neuropathology. *Neurotoxicology*, **33**, 1298–1304.
- Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C. & Bender, J.R.** (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circulation research*, **87**, 677–682.
- Hebb, D.O.** (1949) The Organization of Behavior. A Neuropsychological Theory. *John Wiley and Son: New York*, 1-365
- Ho, K.Y., Evans, W.S., Blizzard, R.M., Veldhuis, J.D., Merriam, G.R., Samojlik, E., Furlanetto, R., Rogol, A.D., Kaiser, D.L. & Thorner, M.O.** (1987) Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **64**, 51–58.

- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H.** (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, **57**, 719–729.
- Huang, W., Quan, C., Duan, P., Tang, S., Chen, W. & Yang, K.** (2016) Nonylphenol induced apoptosis and autophagy involving the Akt/mTOR pathway in prepubertal Sprague-Dawley male rats in vivo and in vitro. *Toxicology*, **373**, 41–53.
- Huang, Y.-F., Wang, P.-W., Huang, L.-W., Yang, W., Yu, C.-J., Yang, S.-H., Chiu, H.-H. & Chen, M.-L.** (2014) Nonylphenol in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks of infants. *Environmental research*, **134**, 143–148.
- Hudish, L.I., Blasky, A.J. & Appel, B.** (2013) miR-219 regulates neural precursor differentiation by direct inhibition of apical par polarity proteins. *Developmental cell*, **27**, 387–398.
- Hung, C.-H., Yang, S.-N., Wang, Y.-F., Liao, W.-T., Kuo, P.-L., Tsai, E.-M., Lee, C.-L., Chao, Y.-S., Yu, H.-S., Huang, S.-K. & Suen, J.-L.** (2013) Environmental alkylphenols modulate cytokine expression in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS one*, **8**, e73534.
- Inoue, K., Yoshimura, Y., Makino, T. & Nakazawa, H.** (2000) Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *The Analyst*, **125**, 1959–1961.
- Ishido, M., Morita, M., Oka, S. & Masuo, Y.** (2005) Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regulatory peptides*, **126**, 145–153.
- Ito, S. & Takeichi, M.** (2009) Dendrites of cerebellar granule cells correctly recognize their target axons for synaptogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 12782–12787.
- Jie, X., Jianmei, L., Zheng, F., Lei, G., Biao, Z. & Jie, Y.** (2013a) Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wiener klinische Wochenschrift*, **125**, 61–70.
- Jie, X., Yang, W., Jie, Y., Hashim, J.H., Liu, X.-Y., Fan, Q.-Y. & Yan, L.** (2010) Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, **89**, 418–428.
- Jie, Y., Fan, Q.-Y., Binli, H., Biao, Z., Zheng, F., Jianmei, L. & Jie, X.** (2013b) Joint neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol and estradiol on F1 male rats. *International journal of environmental health research*, **23**, 321–330.
- Jie, Y., Xuefeng, Y., Mengxue, Y., Xuesong, Y., Jing, Y., Yin, T. & Jie, X.** (2016) Mechanism of nonylphenol-induced neurotoxicity in F1 rats during sexual maturity. *Wiener klinische Wochenschrift*, **128**, 426–434.
- Jobling, S. & Sumpter, J.P.** (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish. An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, **27**, 361–372.
- Kandel, E.R.** (2011) Neurowissenschaften. Eine Einführung. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Kawaguchi, S., Kuwahara, R., Kohara, Y., Uchida, Y., Oku, Y. & Yamashita, K.** (2015a) Oral exposure to low-dose of nonylphenol impairs memory performance in Sprague-Dawley rats. *The Journal of toxicological sciences*, **40**, 43–53.

- Kawaguchi, S., Kuwahara, R., Kohara, Y., Uchida, Y., Oku, Y. & Yamashita, K.** (2015b) Perinatal Exposure to Low-dose Nonylphenol Specifically Improves Spatial Learning and Memory in Male Rat Offspring. *Indian journal of physiology and pharmacology*, **59**, 211–222.
- Kazemi, S., Khalili-Fomeshi, M., Akbari, A., Kani, S.N.M., Ahmadian, S.R. & Ghasemi-Kasman, M.** (2018) The correlation between nonylphenol concentration in brain regions and resulting behavioral impairments. *Brain research bulletin*, **139**, 190–196.
- Kim, A., Jung, B.H. & Cadet, P.** (2014) A novel pathway by which the environmental toxin 4-Nonylphenol may promote an inflammatory response in inflammatory bowel disease. *Medical science monitor basic research*, **20**, 47–54.
- Kim, S., Kim, S.-H., Kim, H., Chung, A.-Y., Cha, Y.I., Kim, C.-H., Huh, T.-L. & Park, H.-C.** (2008) Frizzled 8a function is required for oligodendrocyte development in the zebrafish spinal cord. *Developmental dynamics*, **237**, 3324–3331.
- Kim, Y.-S., Hwang, K.-A., Hyun, S.-H., Nam, K.-H., Lee, C.-K. & Choi, K.-C.** (2015) Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway. *Chemical research in toxicology*, **28**, 662–671.
- Kim, Y.-S., Katase, T., Sekine, S., Inoue, T., Makino, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y. & Yamashita, N.** (2004) Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, **54**, 1127–1134.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F.** (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, **203**, 253–310.
- Kinch, C.D., Kurrasch, D.M. & Habibi, H.R.** (2016) Adverse morphological development in embryonic zebrafish exposed to environmental concentrations of contaminants individually and in mixture. *Aquatic toxicology*, **175**, 286–298.
- Kirby, B.B., Takada, N., Latimer, A.J., Shin, J., Carney, T.J., Kelsh, R.N. & Appel, B.** (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature neuroscience*, **9**, 1506–1511.
- Klecka, G.M., Naylor, C.G., Staples, C.A. & Losey, B.** (2010) Occurrence of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in municipal wastewater treatment plants and receiving waters. *Water environment research*, **82**, 447–454.
- Kopras, E., Potluri, V., Bermudez, M.-L., Williams, K., Belcher, S. & Kasper, S.** (2014) Actions of endocrine-disrupting chemicals on stem/progenitor cells during development and disease. *Endocrine-related cancer*, **21**, 1-12.
- Kraemer, D. & Minichiello, L.** (2010) Cell culture of primary cerebellar granule cells. *Methods in molecular biology*, **633**, 233–239.
- Kudo, C., Wada, K., Masuda, T., Yonemura, T., Shibuya, A., Fujimoto, Y., Nakajima, A., Niwa, H. & Kamisaki, Y.** (2004) Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *Journal of neurochemistry*, **88**, 1416–1423.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A.** (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **138**, 863–870.

- Kusunoki, T., Shimoke, K., Komatsubara, S., Kishi, S. & Ikeuchi, T.** (2008) p-Nonylphenol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in neuronally differentiated PC12 cells. *Neuroscience letters*, **431**, 256–261.
- Ladoux, B. & Nicolas, A.** (2012) Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics*, **75**, 116601.
- Lau, K.-M., Ma, F.M.-T., Xia, J.T., Chan, Q.K.Y., Ng, C.-F. & To, K.-F.** (2017) Activation of GPR30 stimulates GTP-binding of Galphai1 protein to sustain activation of Erk1/2 in inhibition of prostate cancer cell growth and modulates metastatic properties. *Experimental cell research*, **350**, 199–209.
- Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J. & Cooper, R.L.** (2000) Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicological sciences*, **54**, 154–167.
- Le Mellay, V., Grosse, B. & Lieberherr, M.** (1997) Phospholipase C β and Membrane Action of Calcitriol and Estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 11902–11907.
- Lee, J.-S., Padmanabhan, A., Shin, J., Zhu, S., Guo, F., Kanki, J.P., Epstein, J.A. & Look, A.T.** (2010) Oligodendrocyte progenitor cell numbers and migration are regulated by the zebrafish orthologs of the NF1 tumor suppressor gene. *Human molecular genetics*, **19**, 4643–4653.
- Li, M., You, M., Li, S., Qiu, Z. & Wang, Y.** (2019) Effects of maternal exposure to nonylphenol on learning and memory in offspring involve inhibition of BDNF-PI3K/Akt signaling. *Brain research bulletin*, **146**, 270–278.
- Li, S., Jiang, Z., Chai, W., Xu, Y. & Wang, Y.** (2018) Autophagy activation alleviates nonylphenol-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Neurochemistry international*, **122**, 73–84.
- Lin, C.-C., Chien, C.-J., Tsai, M.-S., Hsieh, C.-J., Hsieh, W.-S. & Chen, P.-C.** (2017) Prenatal phenolic compounds exposure and neurobehavioral development at 2 and 7 years of age. *Science of the total environment*, **605-606**, 801–810.
- Linden, D.J.** (1997) Long-Term Potentiation of Glial Synaptic Currents in Cerebellar Culture. *Neuron*, **18**, 983–994.
- Litwa, E., Rzemieniec, J., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W. & Kajta, M.** (2014) Apoptotic and neurotoxic actions of 4-para-nonylphenol are accompanied by activation of retinoid X receptor and impairment of classical estrogen receptor signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **144**, 334–347.
- Litwa, E., Rzemieniec, J., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W. & Kajta, M.** (2016) RXR α , PXR and CAR xenobiotic receptors mediate the apoptotic and neurotoxic actions of nonylphenol in mouse hippocampal cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **156**, 43–52.
- Liu, C., Sun, Y., Song, Y., Saito, T. & Kurasaki, M.** (2015) Nonylphenol diethoxylate inhibits apoptosis induced in PC12 cells. *Environmental Toxicology*, **31**, 1389–1398.
- Liu, H., Yan, Y., Wen, H., Jiang, X., Cao, X., Zhang, G. & Liu, G.** (2014a) A novel estrogen receptor GPER mediates proliferation induced by 17 β -estradiol and selective GPER agonist G-1 in estrogen receptor α (ER α)-negative ovarian cancer cells. *Cell biology international*, **38**, 631–638.

- Liu, X., Nie, S., Chen, Y., Huang, D. & Xie, M.** (2014b) Effects of 4-nonylphenol isomers on cell receptors and mitogen-activated protein kinase pathway in mouse Sertoli TM4 cells. *Toxicology*, **326**, 1–8.
- Liu, X., Nie, S., Yu, Q., Wang, X., Huang, D. & Xie, M.** (2016) Downregulation of steroid hormone receptor expression and activation of cell signal transduction pathways induced by a chiral nonylphenol isomer in mouse sertoli TM4 cells. *Environmental toxicology*, **32**, 469-476
- Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C.J., Südhof, T.C. & Linden, D.J.** (2003) Phosphorylation of RIM1 α by PKA Triggers Presynaptic Long-Term Potentiation at Cerebellar Parallel Fiber Synapses. *Cell*, **115**, 49–60.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., Boer, R. de & Staeb, J.** (2008) Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**, 89–95.
- Lopez-Espinosa, M.J., Freire, C., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R. & Olea, N.** (2009) Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*, **76**, 847–852.
- Losi, G., Prybylowski, K., Fu, Z., Luo, J.H. & Vicini, S.** (2002) Silent synapses in developing cerebellar granule neurons. *Journal of neurophysiology*, **87**, 1263–1270.
- Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D. & Rowitch, D.H.** (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell*, **109**, 75–86.
- Lu, Q.R., Yuk, D., Alberta, J.A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A.P., Stiles, C.D. & Rowitch, D.H.** (2000) Sonic hedgehog—regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, **25**, 317–329.
- Lu, Y.-Y., Chen, M.-L., Sung, F.-C., Wang, P.S.-G. & Mao, I.-F.** (2007) Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environment international*, **33**, 903–910.
- Ma, H., Yao, Y., Wang, C., Zhang, L., Cheng, L., Wang, Y., Wang, T., Liang, E., Jia, H., Ye, Q., Hou, M. & Feng, F.** (2016) Transcription factor activity of estrogen receptor alpha activation upon nonylphenol or bisphenol A treatment enhances the in vitro proliferation, invasion, and migration of neuroblastoma cells. *OncoTargets and therapy*, **9**, 3451–3463.
- MacLusky, N.J., Hajszan, T. & Leranath, C.** (2005a) The Environmental Estrogen Bisphenol A Inhibits Estradiol-Induced Hippocampal Synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives* **113**, 675–679.
- MacLusky, N.J., Luine, V.N., Hajszan, T. & Leranath, C.** (2005b) The 17 α and 17 β isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology*, **146**, 287–293.
- Magruder, H.T., Quinn, J.A., Schwartzbauer, J.E., Reichner, J., Huang, A. & Filardo, E.J.** (2014) The G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1, promotes fibrillogenesis via a Shc-dependent pathway resulting in anchorage-independent growth. *Hormones & cancer*, **5**, 390–404.

- Mao, Z., Zheng, X.-F., Zhang, Y.-q., Tao, X.-X., Li, Y. & Wang, W.** (2012) Occurrence and Biodegradation of Nonylphenol in the Environment. *International journal of molecular sciences*, **13**, 491–505.
- Mao, Z., Zheng, Y.-L. & Zhang, Y.-q.** (2011) Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol. *International journal of molecular sciences*, **12**, 114–127.
- Mao, Z., Zheng, Y.-L., Zhang, Y.-q., Han, B.-p., Chen, L.-t., Li, J., Li, F. & Shan, Q.** (2008) Chronic application of nonylphenol-induced apoptosis via suppression of bcl-2 transcription and up-regulation of active caspase-3 in mouse brain. *Neuroscience letters*, **439**, 147–152.
- Marcomini, A., Pavoni, B., Sfriso, A. & Orio, A.A.** (1990) Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Marine Chemistry*, **29**, 307–323.
- Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P.** (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics*, **7**, 497–508.
- Masuo, Y., Morita, M., Oka, S. & Ishido, M.** (2004) Motor hyperactivity caused by a deficit in dopaminergic neurons and the effects of endocrine disruptors: a study inspired by the physiological roles of PACAP in the brain. *Regulatory peptides*, **123**, 225–234.
- Matsunaga, H., Mizota, K., Uchida, H., Uchida, T. & Ueda, H.** (2010) Endocrine disrupting chemicals bind to a novel receptor, microtubule-associated protein 2, and positively and negatively regulate dendritic outgrowth in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*, **114**, 1333–1343.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H.** (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, **429**, 761–766.
- McCarthy, M.M., Wright, C.L. & Schwarz, J.M.** (2009) New tricks by an old dogma: mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior. *Hormones and behavior*, **55**, 655–665.
- Micevych, P.E., Mermelstein, P.G.** (2008) Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Molecular neurobiology*, **38**, 66–77.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., Falco, A. de, Bontempo, P., Nola, E. & Auricchio, F.** (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO journal*, **15**, 1292–1300.
- Miles-Richardson, S.R., Pierens, S.L., Nichols, K.M., Kramer, V.J., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Render, J.A., Fitzgerald, S.D. & Giesy, J.P.** (1999) Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental research*, **80**, S122-S137.
- Mitew, S., Hay, C.M., Peckham, H., Xiao, J., Koenning, M. & Emery, B.** (2014) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*, **276**, 29–47.
- Mueller, G.C. & Kim, U.H.** (1978) Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. *Endocrinology*, **102**, 1429–1435.
- Mueller, S., Schmid, P. & Schlatter, C.** (1998) Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environmental toxicology and pharmacology*, **5**, 257–265.

- Muenzel, E.J., Schaefer, K., Obirei, B., Kremmer, E., Burton, E.A., Kuscha, V., Becker, C.G., Brosamle, C., Williams, A. & Becker, T.** (2012) Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia*, **60**, 253–270.
- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S. & Ono, H.** (2000) Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats. *Human and experimental toxicology*, **19**, 284–296.
- Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S. & Ono, H.** (2001) Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reproductive toxicology*, **15**, 293–315.
- Nakagomi, M., Suzuki, E., Usumi, K., Saitoh, Y., Yoshimura, S., Nagao, T. & 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. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, **21**, 453–462.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y. & Yoshikawa, Y.** (2004) Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental health perspectives*, **112**, 1159–1164.
- Newman, M., Verdile, G., Martins, R.N. & Lardelli, M.** (2011) Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochimica et biophysica acta*, **1812**, 346–352.
- Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. & Giesy, J.P.** (2001) Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows *Pimephales promelas*. *Environmental toxicology and chemistry*, **20**, 510–522.
- Nishimura, Y., Nagao, T. & Fukushima, N.** (2014) Long-term pre-exposure of pheochromocytoma PC12 cells to endocrine-disrupting chemicals influences neuronal differentiation. *Neuroscience letters*, **570**, 1–4.
- Novitch, B.G., Chen, A.I. & Jessell, T.M.** (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron*, **31**, 773–789.
- Ogiue-Ikeda, M., Tanabe, N., Mukai, H., Hojo, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Takata, N., Kimoto, T. & Kawato, S.** (2008) Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain research reviews*, **57**, 363–375.
- Okada, M., Makino, A., Nakajima, M., Okuyama, S., Furukawa, S. & Furukawa, Y.** (2010) Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *International journal of molecular sciences*, **11**, 4114–4123.
- Otey, C.A., Boukhelifa, M. & Maness, P.** (2003) B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. *Methods in cell biology*, **71**, 287–304.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J. & Scanlan, T.S.** (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, **277**, 1508–1510.

- Panzica, G.C., Aste, N., Viglietti-Panzica, C. & Ottinger, M.A.** (1995) Structural sex differences in the brain: influence of gonadal steroids and behavioral correlates. *Journal of endocrinological investigation*, **18**, 232–252.
- Park, H. & Kim, K.** (2017) Urinary Levels of 4-Nonylphenol and 4-t-Octylphenol in a Representative Sample of the Korean Adult Population. *International journal of environmental research and public health*, **14**, 1-9
- Park, H.-C. & Appel, B.** (2003) Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development*, **130**, 3747–3755.
- Park, H.-C., Mehta, A., Richardson, J.S. & Appel, B.** (2002) *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Developmental biology*, **248**, 356–368.
- Park, S.-H., Cheung, L.W.T., Wong, A.S.T. & Leung, P.C.K.** (2008) Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Molecular endocrinology*, **22**, 2085–2098.
- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F. & Alarcón, R.** (2011) Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and applied pharmacology*, **256**, 379–385.
- Patino-Garcia, D., Cruz-Fernandes, L., Bunay, J., Palomino, J. & Moreno, R.D.** (2018) Reproductive Alterations in Chronically Exposed Female Mice to Environmentally Relevant Doses of a Mixture of Phthalates and Alkylphenols. *Endocrinology*, **159**, 1050–1061.
- Perlman, W.R., Tomaskovic-Crook, E., Montague, D.M., Webster, M.J., Rubinow, D.R., Kleinman, J.E. & Weickert, C.S.** (2005) Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biological Psychiatry*, **58**, 812–824.
- Pillai-Nair, N., Panicker, A.K., Rodriguiz, R.M., Gilmore, K.L., Demyanenko, G.P., Huang, J.Z., Wetsel, W.C. & Maness, P.F.** (2005) Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 4659–4671.
- Pretorius, E., Bornman, M.S., Marx, J., Smit, E. & van der Merwe, C F** (2006) Ultrastructural effects of low dosage endocrine disrupter chemicals on neural cells of the chicken embryo model. *Hormone and metabolic research*, **38**, 639–649.
- Preuss, T.G., Gehrhardt, J., Schirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P.D., Giesy, J.P. & Ratte, H.T.** (2006) Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. *Environmental science & technology*, **40**, 5147–5153.
- Preuss, T.G., Gurer-Orhan, H., Meerman, J. & Ratte, H.T.** (2010) Some nonylphenol isomers show antiestrogenic potency in the MVLN cell assay. *Toxicology in Vitro*, **24**, 129–134.
- Purves, D. & Williams, S.M.** (2001) Neuroscience. 2nd edition. The Initial Differentiation of Neurons and Glia. *Sinauer Associates*.
- Raecker, T., Thiele, B., Boehme, R.M. & Guenther, K.** (2011) Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere*, **82**, 1533–1540.

- Rajendran, K.G., Lopez, T. & Parikh, I.** (1987) Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site. *Biochemical and biophysical research communications*, **142**, 724–731.
- Rex, C.S., Chen, L.Y., Sharma, A., Liu, J., Babayan, A.H., Gall, C.M. & Lynch, G.** (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *The Journal of cell biology*, **186**, 85–97.
- RICHTLINIE 2000/60/EG** Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik.
- RICHTLINIE 2003/53/EG** Amtsblatt der Europäischen Union zur 26. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates über Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Nonylphenol, Nonylphenoethoxylat und Zement)
- Saravanan, M., Nam, S.-E., Eom, H.-J., Lee, D.-H. & Rhee, J.-S.** (2019) Long-term exposure to waterborne nonylphenol alters reproductive physiological parameters in economically important marine fish. *Comparative biochemistry and physiology*, **216**, 10–18.
- Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. & Nakazawa, K.** (2002) Effects of 17 β -Estradiol and Xenoestrogens on the Neuronal Survival in an Organotypic Hippocampal Culture. *Neuroendocrinology*, **76**, 223–234.
- Schmidt, B., Patti, H., Niewersch, C. & Schuphan, I.** (2003) Biotransformation of ring-U-14C4-n-nonylphenol by *Agrostemma githago* cell culture in a two-liquid-phase system. *Biotechnology letters*, **25**, 1375–1381.
- Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W. & Brandt, B.L.** (1974) Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature*, **249**, 224–227.
- Shan, J., Jiang, B., Yu, B., Li, C., Sun, Y., Guo, H., Wu, J., Klumpp, E., Schaffer, A. & Ji, R.** (2011) Isomer-specific degradation of branched and linear 4-nonylphenol isomers in an oxic soil. *Environmental science & technology*, **45**, 8283–8289.
- Shekhar, S., Sood, S., Showkat, S., Lite, C., Chandrasekhar, A., Vairamani, M., Barathi, S. & Santosh, W.** (2017) Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *General and comparative endocrinology*, **241**, 100–107.
- Sherman, D.L. & Brophy, P.J.** (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature Reviews Neuroscience*, **6**, 683–690
- Shikimi, H., Sakamoto, H., Mezaki, Y., Ukena, K. & Tsutsui, K.** (2004) Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats. *Neuroscience letters*, **364**, 114–118.
- Shin, J., Padmanabhan, A., Groh, E.D. de, Lee, J.-S., Haidar, S., Dahlberg, S., Guo, F., He, S., Wolman, M.A., Granato, M., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., Kim, S.-H., Solnica-Krezel, L., Kanki, J.P., Ligon, K.L., Epstein, J.A. & Look, A.T.** (2012) Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Disease models & mechanisms*, **5**, 881–894.
- Shin, J., Park, H.-C., Topczewska, J.M., Mawdsley, D.J. & Appel, B.** (2003) Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods in cell science*, **25**, 7–14.

- Shioji, H., Tsunoi, S., Kobayashi, Y., Shigemori, T., Ike, M., Fujita, M., Miyaji, Y. & Tanaka, M.** (2006) Estrogenic Activity of Branched 4-Nonylphenol Isomers Examined by Yeast Two-Hybrid Assay. *Journal of Health Science*, **52**, 132–141.
- Singh, S. & Li, S.S.-L.** (2012) Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *International journal of molecular sciences*, **13**, 10143–10153.
- Snyder, J.L., Kearns, C.A. & Appel, B.** (2012) Fbxw7 regulates Notch to control specification of neural precursors for oligodendrocyte fate. *Neural development*, **7**, 1-12.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. & Lester, J.N.** (2008) Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment international*, **34**, 1033–1049.
- Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, M.F. & Ruiz-Lopez, M.D.** (1995) Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clinical chemistry*, **41**, 1888–1895.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. & Sonnenschein, C.** (1991) p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental health perspectives*, **92**, 167–173.
- Statistisches Bundesamt (Destatis)** (2018) Statistisches Jahrbuch. Gesundheit.
- Suter, D.M. & Forscher, P.** (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of neurobiology*, **44**, 97–113.
- Takada, N., Kucenas, S. & Appel, B.** (2010) Sox10 is necessary for oligodendrocyte survival following axon wrapping. *Glia*, **58**, 996–1006.
- Tan, B. & Ali Mohd, M.** (2003) Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. *Talanta*, **61**, 385–391.
- Tanaka, E. & Sabry, J.** (1995) Making the connection: Cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell*, **83**, 171–176.
- Tawk, M., Makoukji, J., Belle, M., Fonte, C., Trousson, A., Hawkins, T., Li, H., Ghandour, S., Schumacher, M. & Massaad, C.** (2011) Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *The Journal of Neuroscience*, **31**, 3729–3742.
- Ter Veld, M.G.R., Zawadzka, E., van den Berg, J.H.J., van der Saag, P.T., Rietjens, I.M.C.M. & Murk, A.J.** (2008) Food-associated estrogenic compounds induce estrogen receptor-mediated luciferase gene expression in transgenic male mice. *Chemico-biological interactions*, **174**, 126–133.
- Thiele, B., Guenther, K. & Schwuger, M.J.** (1997) Alkylphenol Ethoxylates. Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chemical Reviews*, **97**, 3247–3272.
- Thiele, B., Heinke, V., Kleist, E. & Guenther, K.** (2004) Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical p-nonylphenol. *Environmental science & technology*, **38**, 3405–3411.
- Toyooka, T., Kubota, T. & Ibuki, Y.** (2012) Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutation Research*, **741**, 57–64.

- Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K. & Mishina, M.** (2010) Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, **141**, 1068–1079.
- Van Echten-Deckert, G., Zschoche, A., Bar, T., Schmidt, R. R., Raths, A., Heinemann, T. & Sandhoff, K.** (1997) Cis-4-Methylsphingosine Decreases Sphingolipid Biosynthesis by Specifically Interfering with Serine Palmitoyltransferase Activity in Primary Cultured Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 15825–15833.
- Verderame, M. & Scudiero, R.** (2017) Estrogen-dependent, extrahepatic synthesis of vitellogenin in male vertebrates: A mini-review. *Comptes rendus biologiques*, **340**, 139–144.
- Vinas, R. & Watson, C.S.** (2013) Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non-genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environmental Health*, **12**, 1-11
- Vosges, M., Kah, O., Hinfrey, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarous, Y., Porcher, J.-M. & Brion, F.** (2012) 17 α -Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reproductive Toxicology*, **33**, 198–204.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S. & Marc, J.** (2014) The many faces of estrogen signaling. *Biochemia medica*, **24**, 329–342.
- Wade, C.B. & Dorsa, D.M.** (2003) Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*, **144**, 832–838.
- Watson, C.S., Pappas, T.C. & Gametchu, B.** (1995) The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 41–50.
- Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G. & Dorsa, D.M.** (1997) Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, **138**, 4030–4033.
- Weiss, B.** (2007) Can endocrine disruptors influence neuroplasticity in the aging brain? *Neurotoxicology*, **28**, 938–950.
- Westerfield, M.** (2007) The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). *University of Oregon Press, Eugene*.
- Wheeler, T.F., Heim, J.R., LaTorre, M.R. & Janes, A.B.** (1997) Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC—MS. *Journal of Chromatographic Science*, **35**, 19–30.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. & Parker, M.G.** (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, **135**, 175–182.
- Wu, Z., Zhang, Z., Chen, S., He, F., Fu, G. & Liang, W.** (2007) Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China. *Fresenius Environmental Bulletin*, 227–234.
- Xia, J., Niu, C. & Pei, X.** (2010) Effects of chronic exposure to nonylphenol on locomotor activity and social behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of environmental sciences*, **22**, 1435–1440.

- Xiao, J., Shao, B., Wu, X., Sun, X. & Wu, Y.** (2011) A study on bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol in human urine amples detected by SPE-UPLC-MS. *Biomedical and environmental sciences*, **24**, 40–46.
- Xiao, X., Mruk, D.D., Tang, E.I., Wong, C.K.C., Lee, W.M., John, C.M., Turek, P.J., Silvestrini, B. & Cheng, C.Y.** (2014) Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Human reproduction*, **29**, 1279–1291.
- Xu, X., Lu, Y., Zhang, G., Chen, L., Tian, D., Shen, X., Yang, Y. & Dong, F.** (2014) Bisphenol A promotes dendritic morphogenesis of hippocampal neurons through estrogen receptor-mediated ERK1/2 signal pathway. *Chemosphere*, **96**, 129–137.
- Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I. & Seo, Y.R.** (2015) Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of cancer prevention*, **20**, 12–24.
- Ying, F., Ding, C., Ge, R., Wang, X., Li, F., Zhang, Y., Zeng, Q., Yu, B., Ji, R. & Han, X.** (2012) Comparative evaluation of nonylphenol isomers on steroidogenesis of rat Leydig Cells. *Toxicology in Vitro*, **26**, 1114–1121.
- Ying, G.-G. & Kookana, R.S.** (2005) Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2640–2645.
- Ying, G.-G., Williams, B. & Kookana, R.** (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment international*, **28**, 215–226.
- Yokosuka, M., Ohtani-Kaneko, R., Yamashita, K., Muraoka, D., Kuroda, Y. & Watanabe, C.** (2008) Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicology in Vitro*, **22**, 1–9.
- Yu, C.-J., Du, J.-C., Chiou, H.-C., Yang, S.-H., Liao, K.-W., Yang, W., Chung, M.-Y., Chien, L.-C., Hwang, B. & Chen, M.-L.** (2016) Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Nonylphenol Levels: A Case-Control Study in Taiwanese Children. *PloS one*, **11**, e0149558.
- Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T. & Seger, R.** (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 15799–15808.
- Zhang, H., Oppel, I.M., Spitteller, M., Guenther, K., Boehmler, G. & Zuehlke, S.** (2009a) Enantiomers of a nonylphenol isomer: absolute configurations and estrogenic potencies. *Chirality*, **21**, 271–275.
- Zhang, H., Spitteller, M., Guenther, K., Boehmler, G. & Zuehlke, S.** (2009b) Degradation of a chiral nonylphenol isomer in two agricultural soils. *Environmental pollution*, **157**, 1904–1910.
- Zhang, H., Zuehlke, S., Guenther, K. & Spitteller, M.** (2007) Enantioselective separation and determination of single nonylphenol isomers. *Chemosphere*, **66**, 594–602.
- Zhou, F., Zhang, L., Liu, A., Shen, Y., Yuan, J., Yu, X., Feng, X., Xu, Q. & Cheng, C.** (2013) Measurement of phenolic environmental estrogens in human urine samples by HPLC-MS/MS and primary discussion the possible linkage with uterine leiomyoma. *Journal of Chromatography B*, **938**, 80–85.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G.** (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, **64**, 355–405.

Danksagung

152 Seiten, 42.930 Wörter, 313.582 Zeichen - auch wenn uns der moderne Zeitgeist zu Einzelkämpfern zu erziehen versucht, so sind die großen Etappen im Leben nicht ohne die Unterstützung anderer Menschen zu erreichen. In diesem Sinne möchte ich an dieser Stelle allen danken, die mich in meinen Bemühungen um diese Arbeit auf die vielfältigste Weise unterstützt haben.

Großer Dank gebührt zu allererst Frau PD Dr. Simone Diestel, die diese Arbeit geboren und großgezogen hat und mir die beste Doktormutter war, die man sich wünschen kann. Ohne ihre geduldige Betreuung, konstruktive Kritik und ihr stets offenes Ohr für Fragen wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Ebenfalls danken möchte ich meinem zweiten Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Günther für die fachlichen Anregungen und sein stetes Bemühen, einem chemisch nicht so versierten Menschen diese Kunst näher zu bringen.

Mein weiterer großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Human Metabolomics, vor allem Yvonne Becker, Christine Laurini, Sarah Förster und Marius Schäfer, die mir an manchen Tagen aus der Krise geholfen und meinen Sorgen und Ängsten aktive Sterbehilfe geleistet haben. Danke an Yvonne Becker für die Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und die emotionale Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ein weiteres Dankeschön gilt den Arbeitsgruppen des Anatomischen Instituts für die fachübergreifende und befruchtende Kooperation, vor allem Herrn Prof. Dr. Benjamin Odermatt, sowie Felix Häberlein, Enrico Mingardo, Maik Hintze, Tobias Lindenberg und Anna Japp.

Danke an Tomi Balen, der mir ausnahmslos und immer wieder gezeigt hat, wie ich mein persönliches Netzlaufwerk wiederherstellen kann und der mit seiner Geduld dem Paradigma von „Frauen und Technik“ erst Leben eingehaucht hat.

Ausdrücklich danken möchte ich meinen lieben Eltern, meinem Opa Karl und meiner besten Freundin Cati für ihre moralische Unterstützung und ihren Glauben an mich. Ohne deren Liebe und Fürsorge, auf die ich mich immer verlassen konnte, wäre diese Promotion nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass ich die vorgelegte Arbeit persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.
- dass aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind.
- dass die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind.
- dass ich mich nicht bereits ohne Erfolg einem Promotionsversuch unterzogen habe.
- dass für die Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten, in Anspruch genommen wurde.

Bonn, den

Carina Jockschat