

Diss. ETH No. 13968

**Assessment of environmental compounds  
with estrogenic activity in  
juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and  
in the rainbow trout gonad cell line RTG-2**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
GABRIELE ACKERMANN  
Dipl. Biol., Biozentrum, University of Basel  
born on January 19, 1970  
citizen of Wolfwil (SO)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Theo Koller, examiner  
Prof. Dr. Fritz Thoma, co-examiner

Zürich, 2000

## Summary

The incidence of alterations in the normal pattern of reproductive development and in hormone-linked physiological processes seen in some populations of wildlife, led to the hypothesis that a number of chemicals released into the environment have the potential to disrupt endocrine pathways. In recent years, a number of man-made and naturally occurring compounds have been shown to be able to mimic endogenous hormones. Among the most well-characterized of these substances are the so-called environmental estrogens. They elicit effects, which are similar to those produced by endogenous estrogens such as 17 $\beta$ -estradiol (E2), although they are structurally not always related. The occurrence and distribution of environmental estrogens and the implications of exposure to these compounds have not yet been thoroughly investigated.

The incidence of widespread sexual disruption in wild fish observed in the United Kingdom, which correlates with increased production of vitellogenin (VG), an egg yolk precursor protein synthesized in presence of estrogens, and with the concentration of sewage treatment effluent burdens in rivers, caused us to investigate the causality between estrogenic effects in fish and the presence of nonylphenol (NP), an estrogenic compound found in sewage treatment plant (STP) effluents. Since exposure of early life stages of fish to estrogen and estrogen-like compounds has been shown to have profound effects on sexual differentiation, such as feminization and the induction of hermaphroditism, we continuously exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the embryonic, larval and juvenile life stage to environmentally relevant concentrations of NP. After a one-year period, sex-ratios, gonadal development, VG and VG mRNA as well as zona radiata protein (ZRP) expression were examined. Analogous to VG expression, ZRP production is under the control of estrogen, is synthesized in the liver of egg-laying vertebrates, and serves as a biomarker of estrogen exposure. The mortality and hatching rates determined during the experiment were not affected by NP. We found that juvenile rainbow trout were sensitive to the estrogenic activity of NP after long-term exposure, since they produced significantly elevated levels of VG in response to the presence of 1.05 and 10.17  $\mu\text{g/l}$  NP. Significant induction of ZRP occurred not until exposure to

10.17  $\mu\text{g/l}$  NP. No adverse effects on gonadal development or sex determination were observed, which would be of biological relevance with regard to fertility, reproduction, and on a higher level to the fate of populations. Our findings strongly suggest that the occurrence of elevated levels of expressed VG, the most widely accepted biomarker of estrogen exposure, does not ultimately coincide with impaired sexual development. The current NP levels in sewage effluents, but also in severely polluted rivers are occasionally in the range of the effect concentrations, which induce VG and ZRP synthesis in rainbow trout. However, the biological significance of elevated VG and ZRP levels in response to environmental estrogens remains speculative. Since no alterations in sexual development could be attributed to the estrogenic effect of NP at environmentally relevant concentrations, the observed sexual disruption in wild fish may be caused by other, more potent estrogens present in STP effluents or by a mixture of chemicals.

The determination of VG mRNA levels was performed by establishing a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) method. The unique sensitivity of this approach allowed the detection and quantification of VG transcripts in the small livers of juvenile rainbow trout. We could not show a significant overall increase in VG mRNA levels in response to NP exposure, as it was the case for VG. The discrepancy in NP-mediated VG mRNA and VG induction may be due to an increased half-life of VG mRNA or an intensified VG translation during long-term exposure to estrogens. QC-RT-PCR was also applied in the determination of expressed estrogen receptor (ER) levels in fish cell lines.

An important consideration in hazard identification is to what degree extrapolation of measured estrogenic effects among species is possible. Although evidence of considerable structural homology of the ER across species exists, it is not clear that this homology is adequate as a basis for quantitative extrapolation in terms of the affinity of the receptor for endogenous or exogenous ligands and interactions of the ligand-receptor complex with DNA. The uncertainty about to what extent species-specific differences can be neglected, led us to the development of a fish cell line-based screening tool, which allows the identification of estrogenicity elicited by single compounds and environmental samples, such as STP effluents. Among the three fish cell lines PLHC-1, RTL-W1 and RTG-2, the rainbow trout gonad cell line RTG-2 was the only one suitable for the establishment of

an estrogen-responsive bioassay. Cells were transiently transfected with a plasmid carrying the DNA-binding site for an activated ER in the promoter region of an inducible reporter gene, and an internal control plasmid, whose constitutively expressed reporter gene product was used to normalize for transcriptional activity. Since RTG-2 cells do not have functional ERs, which can trigger the expression of an estrogen-responsive reporter gene upon activation, rainbow trout (rt) ER cDNA was either introduced by co-transfection or by a stable integration into the genome of RTG-2 cells. The transcriptional activity of the rtER was measured after 48 h of exposure to environmental estrogens or STP effluent samples. The determination of complete dose-response curves allowed the estimation of the effect concentration at which 50% reporter gene activity was reached (EC50). The comparison of the EC50s estimated in our system with those found in non-fish reporter gene assays revealed that despite mammalian ERs generally have a higher sensitivity for E2, in the presence of environmental estrogens the rtER reached half-maximal activation at similar or somewhat lower concentrations. Our findings provide some relief from the uncertainty that the rtER and the mammalian ERs would be activated significantly different by environmental estrogens, and consequently extrapolation between fish and mammals would be intricate. However, the application of the RTG-2 reporter gene assay for the identification of estrogenic activity of single compounds, defined mixtures and STP effluents, possibly hazardous to fish, may be preferable to non-fish screening tools, due to the obvious fact that a fish cell line displays more fish characteristics than mammalian or yeast cells.

The adaptation of fish cell lines to growth conditions with a reduced or even no content of fetal bovine serum (FBS) was a prerequisite for the successful establishment of an estrogen-responsive *in vitro* assay, since FBS contains endogenous estrogens.

In RTG-2 and PLHC-1 cells, an ER gene fragment with strong homology to ER subtypes  $\beta$  of fish and other animal classes was identified. This proves for the expression of two ER subtypes,  $\alpha$  and  $\beta$ , in rainbow trout. Concerning PLHC-1 cells, this is the only report on the occurrence of transcribed ER. The presence of an additional ER subtype widens the uncertainties about ER-mediated effects provoked by environmental estrogens, since ligand- and DNA-binding preferences, expression patterns and levels, and its role in sexual development are not yet investigated.

## Zusammenfassung

In einigen Populationen wildlebender Tiere wurden Störungen in der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane und Veränderungen in Prozessen, die durch Hormone reguliert werden festgestellt. Dies führte zur Hypothese, dass es in der Umwelt Stoffe geben muss, die störend in das endokrine System von Lebewesen eingreifen und dadurch Wirkungen erzeugen, die Entwicklung und Fortpflanzung beeinträchtigen. In den vergangenen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass es tatsächlich in der Umwelt Stoffe gibt, natürlichen Ursprungs oder synthetischer Herstellung, die eine ähnliche Wirkung entfalten wie körpereigene Hormone. Am besten untersucht sind diejenigen Substanzen, die sich ähnlich wie das weibliche Geschlechtshormon 17 $\beta$ -Östradiol (Ö2) verhalten. Sie werden deshalb Umweltöstrogene genannt. Das Vorkommen und die Verbreitung von Umweltöstrogenen wie auch die Auswirkungen einer Exposition an solche sind unzureichend untersucht.

In Grossbritannien wurde ein weitverbreitetes Auftreten von Störungen in der Geschlechtsentwicklung bei wild lebenden Fischen beschrieben. Dieser Befund korreliert sowohl mit einer erhöhten Produktion an Vitellogenin (VG), einem Protein, das später im Eidotter eingelagert wird und unter dem Einfluss von Östrogenen synthetisiert wird, als auch mit dem Eintrag von Kläranlagewasser (KAW) in die untersuchten Flüsse. Dies veranlasste uns, eine mögliche Kausalität zwischen östrogenen Effekten in Fischen und der Anwesenheit von Nonylphenol (NP), einer östrogen wirkenden Substanz, die in KAW vorkommt, zu untersuchen. Da gezeigt werden konnte, dass die Exposition von frühen Lebensstadien von Fischen an Östrogene oder Stoffe, die wie Östrogene wirken, Störungen der Geschlechtsentwicklung wie Verweiblichung oder die Ausbildung von Hermaphroditen bewirken, exponierten wir Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) während ihres embryonalen, larvalen und juvenilen Lebensstadiums an Konzentrationen von NP, wie sie in der Umwelt vorkommen. Nach einem Jahr Exposition wurde das Geschlechterverhältnis, die Gonadenentwicklung, die Produktion von VG, VG mRNA und Zona Radiata Proteinen (ZRP) untersucht. Analog zu der Synthese von VG, werden ZRP auch unter der Kontrolle von Östrogenen in der Leber von Eier legenden Wirbeltieren hergestellt. VG wie auch ZRP sind etablierte „Biomarker“, die eine Exposition an Östrogene anzeigen. Die

Mortalität und Schlupfraten der Fische wurden während unseres Experiments durch NP nicht beeinträchtigt. Erhöhte Gehalte an VG in der Leber der Fische konnten nach einjähriger Exposition sowohl bei einer Konzentration von 1.05 als auch bei 10.17  $\mu\text{g/l}$  NP festgestellt werden. Die ZRP Produktion war nur bei Exposition an 10.17  $\mu\text{g/l}$  NP signifikant erhöht. NP hatte weder einen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis, noch beeinträchtigte es die Geschlechtsentwicklung, beides Determinanden von hoher biologischer Relevanz hinsichtlich Fruchtbarkeit, Fortpflanzungsfähigkeit und Fortbestehen einer Population. Unsere Ergebnisse zeigen, dass erhöhte Gehalte des Biomarkers VG nicht zwingend mit einer beeinträchtigten Geschlechtsentwicklung zusammenfallen. Die zeitweiligen Konzentrationen an NP in KAW und Flüssen bewegen sich in der Größenordnung, in der sie eine Produktion von VG und ZRP in Regenbogenforellen verursachen können. Über die biologische Relevanz von erhöhten VG und ZRP Gehalten wird jedoch spekuliert. Da NP bei Konzentrationen, wie sie in der Umwelt vorkommen keine Beeinträchtigung der Geschlechtsentwicklung herbeigeführt hat, muss davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Störungen in der Geschlechtsentwicklung bei wild lebenden Fischen in Grossbritannien durch andere, potentere Östrogene ausgelöst oder durch eine Mischung von Chemikalien, wie sie in KAW typischerweise vorkommt, verursacht wurden.

Die Bestimmung der VG mRNA Gehalte in den Fischlebern wurde durch eine quantitative Methode basierend auf einer kompetitiven Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die Methode wurde innerhalb dieser Arbeit etabliert und ebenfalls für die Quantifizierung von Östrogenrezeptor (ÖR) mRNA in Fischzell-Linien verwendet. Die einzigartige Empfindlichkeit dieser Methode erlaubte die Quantifizierung von VG Transkripten in den noch kleinen Lebern der Jungfische, als auch von ÖR Transkripten in Fischzell-Linien. Hinsichtlich VG mRNA konnte keine allgemeine Erhöhung der Gehalte in Abhängigkeit von NP, wie es bei VG der Fall war, festgestellt werden. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell mit einer erhöhten Stabilität der VG mRNA oder einer Zunahme der Translationseffizienz bei VG erklären.

Bei der Identifizierung von schädlichen Stoffen ist es wichtig zu erwägen, bis zu welchem Grad die festgestellten Effekte über Tierarten oder gar Klassen hinweg extrapoliert werden können. Obwohl die ÖR verschiedener Organismen eine starke Homologie in der Struktur aufweisen,

ist es unklar, ob auf Grund dieser Homologie gleiche Affinitäten des Rezeptors zu körpereigenen wie fremden Liganden und ein gleiches Bindungsverhalten des Rezeptor-Ligand Komplexes an die DNS erwartet werden können. Die Unsicherheit darüber, bis zu welchem Ausmass Art- oder Klassen-spezifische Unterschiede vernachlässigt werden können, veranlasste uns einen Biotest zu entwickeln, der mit einer Fischzell-Linie durchgeführt werden soll und der zur Überprüfung der Östrogenizität von Einzelsubstanzen sowie Umweltproben wie KAW eingesetzt werden kann. Von den drei Fischzell-Linien PLHC-1, RTL-W1 und RTG-2, deren Eignung für einen solchen Test abgeklärt wurde, kam nur die Regenbogenforelle Gonaden Zell-Linie RTG-2 in Frage. Die Zellen wurden sowohl mit einem Plasmid, das ein induzierbares Reporter-gen trägt als auch mit einem zweiten Plasmid, das mit einem konstitutiv angeschalteten Reporter-gen ausgerüstet ist, transient transfiziert. Das induzierbare Reporter-gen hat in seiner Promoter-Region eine Sequenz, die vom aktivierten ÖR erkannt und gebunden wird. Die Bestimmung des zweiten Reporter-gens dient der Normalisierung der induzierbaren Reporter-genaktivität. Da RTG-2 Zellen keinen funktionsfähigen ÖR haben, der nach Aktivierung durch ein Östrogen das induzierbare Reporter-gen anschalten könnte, musste der Regenbogenforelle-ÖR (RF-ÖR) in Form seiner cDNA entweder ebenfalls transient transfiziert zugegeben werden, oder aber er wurde durch Transfektion stabil in das Genom integriert. Die Transkriptionsaktivität des RF-ÖR wurde nach einer 48-stündigen Exposition an Umweltöstrogene oder KAW gemessen. Die Bestimmung von vollständigen Dosis-Wirkungskurven erlaubte eine Abschätzung derjenigen Effektkonzentration, bei der 50% der Reporter-genaktivität erreicht wurde (EK50). Obwohl der Säuger ÖR Ö2 empfindlicher bindet als der RF-ÖR, ergab ein Vergleich der EK50, die wir bestimmt haben mit denjenigen, die mittels anderer, nicht Fisch-Reporter-gen-Systemen abgeschätzt wurden, dass die EK50 von Umweltöstrogenen ähnlich oder gar tiefer sind als diejenigen, die in Anwesenheit eines Säuger ER bestimmt wurden. Empfindlichkeiten für Ö2 in Nicht-Fisch-Reporter-gen-Systemen höher sind. Unsere Ergebnisse erlauben etwas Erleichterung über die Sorge, dass der RF-ÖR durch Umweltöstrogene signifikant anders aktiviert und so eine Extrapolation des Effekts von Säugern auf Fische erschwert wird. Zum Schluss sei bemerkt, dass die Verwendung des RTG-2 Reporter-gen-Systems zur Identifizierung der Östrogenizität von Einzelsubstanzen, definierten Mischungen und KAW, die möglicherweise für Fische schädlich sind, einem Nicht-Fisch-System vorzuziehen ist. Der Grund

dafür liegt nahe. Eine Fischzell-Linie zeigt in ihrer Eigenart mehr Fischspezifische Charakteristiken als Säugerzellen oder eine Hefe.

Die Adaptation von Fischzell-Linien an Wachstumsbedingungen mit reduziertem oder keinem Gehalt an fötalem Kälberserum (FKS) war eine Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung eines *in vitro* Tests zur Identifikation von Östrogenizität, da FKS selber Östrogene enthält.

Im Verlauf dieser Studien, wurde ein ÖR Genfragment in RTG-2 und PLHC-1 Zellen identifiziert, das eine starke Homologie zu ÖR Typ  $\beta$  anderer Fische und Tierklassen hat. Dies zeigt, dass in der Regenbogenforelle beide ÖR Typen,  $\alpha$  und  $\beta$ , an einer östrogenen Antwort beteiligt sein können. In PLHC-1 Zellen ist es das erste Mal, dass über ein ÖR Gen berichtet wird. Das Auftreten eines neuen ÖR Typs vergrößert die Unsicherheit über ÖR-vermittelte Effekte verursacht durch Umweltchemikalien, da weder die Präferenzen bezüglich Ligand- und DNS-Bindung hinreichend bekannt sind, noch Klarheit über die vorkommenden Gehalte in den verschiedenen Geweben und Organen der Organismen besteht. Ebenfalls ist seine Rolle in der Geschlechtsentwicklung noch nicht verstanden.