

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg  
im  
Bereich der Biologie

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Britta Kais  
Geboren in Bremen

Datum der mündlichen Prüfung  
2.11.2018



**Eignet sich der Fischembryotest (FET) als Werkzeug  
zur Bestimmung  
von spezifischer Toxizität in Embryonen des  
Zebrabärblings (*Danio rerio*)?**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck, COS, Universität Heidelberg  
Prof. Dr. Uwe Strähle, KIT, Universität Karlsruhe

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanzierten Projektes DanTox erstellt („DanTox – Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)“, Teilprojekt B, Universität Heidelberg: „Mikroskopie und Live-Imaging zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)“;AZ 02WU1054).

*Meinem Vater.*

Helmut Erich Kais  
(07.02.1938 - † 05.02.1995)



## DANKSAGUNG

Diese Arbeit hat mich lange in meinem Leben begleitet und daher möchte ich meine Danksagung in zwei Abschnitte teilen.

### **Für den empirischen Teil meiner Doktorarbeit gilt mein Dank:**

V.a. Herrn Prof. Dr. Thomas Braunbeck, der mich in einer schwierigen Zeit als Doktorandin aufnahm, mir die selbstständige Betreuung des DanTox-Projektes zutraute, alle meine Forschungsideen stets unterstützte und mir letztendlich das eigenständige Publizieren ermöglichte, vielen Dank dafür!

Herrn Prof. Dr. Uwe Strähle, der damals ohne Zögern sofort die Übernahme des Koreferats übernahm und stets Interesse an meinen Ergebnissen zeigte.

Dem DanTox-Team für die gute und nette Zusammenarbeit: v.a. Dr. Steffen Keiter, Prof. Dr. Henner Hollert, Dr. Sabrina Schiwy und Prof. Dr. Richard Ottermanns, der niemals müde wurde, mir die Statistik näherzubringen.

Mein besonderer Dank für die Zeit während und nach der Doktorarbeit geht an Franziska Kremer, mit der ich zahlreiche Tierreich-Stunden durchlebte und die mir als sehr gute Freundin, v.a. in der Abschlussphase dieser Arbeit, unermüdlich zur Seite stand!

Der gesamten Arbeitsgruppe „Aquatische Ökologie und Toxikologie“ sowie auch der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Frings danke ich für die vielen lustigen gemeinsamen Stunden, Erlebnissen, Feiern, (SETAC)-Reisen, fachlichen Diskussionen und überhaupt einer wundervollen Zeit! Namentlich danke ich: Daniel Stengel, Annika Batel, Katharina Pelka, Svenja Böhler, Patrick Heinrich, Ruben Strecker, Christopher Fassbender, Florian Schmidt, Nadja Schweizer, Semir Jeridi, Federica Genovese, Kerstin Vocke, Kristin Dauner, Franziska Neureither, Susanne Keiter, Susanne Knörr, Weiping Zhang, Frank Möhrlen, Erik Leist und meinen Studenten: Anika Helleis, Alexander Keth, Markus Lutz, Ellen Steudle, Katharina Heye, Franziska Scheller, Leon Kreuter, Sina Volz, Kristina Rehberger, Kai Reschke, Natalya Demir und Sophia Oberrauch.

**Für den schriftlichen Teil meiner Arbeit**, d.h. für die Erstellung der gesamten Publikationen sowie dem Verfassen der hier vorliegenden deutschen Arbeit, möchte ich v.a. einer Person meinen größten Dank aussprechen: meinem Mann, Michael Letschert! Ohne seine Geduld, Zuversicht, Motivation und Glauben an mich, wäre diese Arbeit nicht fertiggestellt worden! Vielen Dank für die großartige Unterstützung!!!

Außerdem möchte ich meiner Tochter, Lina Letschert, danken, deren Freude und Frohsinn mich stets motiviert hat, einfach weiter zu machen.

Ich danke meinen Schwiegereltern, Helga und Wilfried Letschert, die zahllose Babysittertage absolvierten, damit ich in Ruhe arbeiten konnte.

Ein Dankeschön geht ebenfalls an meine Mutter, Ursula Kais, für die jahrelange Unterstützung meines Studiums.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner neugewonnenen Freundin, Silke Gruner, danken, die sich netterweise sofort als Korrekturleserin angeboten hat.



Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Folgende Publikationen wurden in die vorliegende Dissertation integriert:

- Kais B, Ottermanns R, Scheller F, Braunbeck T. Modification and quantification of *in vivo* EROD live-imaging with zebrafish (*Danio rerio*) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A. *Sci Total Environ* 2018; 615: 330-347. Zitiert als: (Kais et al., 2018)
- Kais B, Schiwy S, Hollert H, Keiter SH, Braunbeck T. *In vivo* EROD assays with the zebrafish (*Danio rerio*) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity. *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280. Zitiert als: (Kais et al., 2017)
- Kais B, Stengel D, Batel A, Braunbeck T. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 16329-16339. Zitiert als: (Kais et al., 2015)
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 16247-16261. Zitiert als: (Braunbeck et al., 2015)
- Kais B, Schneider KE, Keiter S, Henn K, Ackermann C, Braunbeck T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquat Toxicol* 2013; 140-141: 229-238. Zitiert als: (Kais et al., 2013)
- Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafärbling (*Danio rerio*), Keiter et al., 2013, 318 S.

Die Verwendung ganzer Abschnitte aus den Publikationen wurden in den entsprechenden Kapiteln gekennzeichnet. Alle Texte wurden im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Die Ergebnisse aus den folgenden Bachelorarbeiten sind in diese Dissertation teilweise integriert. Die Arbeiten beruhen auf meinen Ideen und die durchgeführten Versuche wurden von mir konzipiert und betreut. Alle entnommenen Daten wurden von mir gemeinsam mit den Studenten erhoben, ausgewertet und dargestellt.

- Anika Helleis (2011): „*Embryotoxizität und induzierte Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität von Chlorpyrifos und  $\beta$ -Naphthoflavon auf die Embryonalentwicklung des Zebrafärblings (*Danio rerio*)*“ integriert in Kapitel 2.1.1; 3.1.2 und 3.2.4
- Katharina Heye (2012): „*Die Wirkung von 2,3-Benzofuran auf Cytochrom P<sub>450</sub> 1A in der Embryonalentwicklung des Zebrafärblings (*Danio rerio*)*“ integriert in Kapitel 2.1.1; 3.1.6, 4.1.7 und 4.2.3
- Ellen Steudle (2012): „*Fischembryotoxizität und Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität von Chinolin im Zebrafärbling (*Danio rerio*)*“ integriert in Kapitel 2.1.1; 3.1.5; 4.1.6 und 4.2.3
- Franziska Scheller (2013): „*Teratogenicity of Aroclor 1254 and cytochrome P450 activity in zebrafish embryos (*Danio rerio*)*“ integriert in Kapitel 2.1.1; 3.1.4; 3.2.2; 3.2.6; 4.1.5 und 4.2.3
- Kai Reschke (2013): „*Induction and inhibition of cytochrome P450 1A in zebrafish (*Danio rerio*) early development upon exposure to Aroclor 1254, Chlorpyrifos and a highly contaminated sediment extract*“ integriert in Kapitel 3.2.9

Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt oder die Dissertation in dieser oder einer anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den \_\_\_\_\_

Britta Kais



# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	1
ABSTRACT.....	2
EINLEITUNG .....	3
1.1    Historischer Hintergrund des Fischembryotests .....	3
1.2    Die Rolle des Chorions im Fischembryotest .....	4
1.3    Lösungsmittel: DMSO im Fischembryotest .....	5
1.4    Die Notwendigkeit der EC <sub>10</sub> Bestimmung.....	6
1.5    Auswahl der Testsubstanzen.....	6
1.6    Teratogenität und Bioaktivierung von Xenobiotika in Fischembryonen.....	7
1.7    Die EROD-Aktivität als Biomarker im Fischembryotest .....	8
1.8    Die Rolle von inhibiertem CYP1A .....	10
1.9    Anwendbarkeit des Live-Imaging-EROD-Assays für komplexe Umweltproben .	11
1.10   Der Nachweis von neurotoxischen Substanzen mit dem AChE-Assay.....	12
1.11   Allgemeine Ziele dieser Arbeit.....	15
MATERIALIEN & METHODEN .....	16
2.1    Der Fischembryo-Test und die EC <sub>10</sub> -Bestimmung.....	16
2.1.1   Die Testsubstanzen.....	16
2.1.2   Sedimentaufbereitung und –charakterisierung.....	19
2.1.3   Testorganismus -und Fischhälterung .....	23
2.1.4   Der Standard-Fischembryotest (FET) .....	24
2.1.5   Statistik.....	25
2.2    Live-Imaging-EROD-Assay .....	26
2.2.1   Exposition der 24-Well-Platten.....	26
2.2.2   Exposition beim Kombinationsversuch .....	27
2.2.3   Vorbereitung der Wellplatten für die 7-Ethoxyresorufin-Inkubation .....	27
2.2.4   Präparation der Larven .....	28
2.2.5   Mikroskopische Auswertung am Nikon ECLIPSE 90i:.....	29
2.2.6   Quantitative Auswertung.....	30
2.3    AChE-Assay .....	30
2.3.1   Testprinzip: Ellmans-Esterase Assay .....	30
2.3.2   Exposition der Embryonen für den Acetylcholinesterase-Assay.....	31
2.3.3   Probenvorbereitung für die Messung.....	33

2.3.4	Statistik.....	33
ERGEBNISSE .....		34
3.1	Fischembryo-Test - EC <sub>10</sub> -Bestimmung.....	34
3.1.1	Methylquecksilberchlorid.....	34
3.1.2	Chlorpyrifos .....	35
3.1.3	Bisphenol A.....	38
3.1.4	Aroclor 1254 .....	39
3.1.5	Chinolin.....	40
3.1.6	2,3-Benzofuran.....	41
3.1.7	Sedimentextrakte.....	42
3.2	Live-Imaging-EROD-Assay .....	47
3.2.1	CYP1A-Induktion in der Embryonalentwicklung.....	47
3.2.2	Modifizierung des EROD-Assays.....	48
3.2.3	Methylquecksilberchlorid im EROD-Assay .....	50
3.2.4	Chlorpyrifos im EROD-Assay .....	50
3.2.5	Bisphenol A im EROD-Assay.....	56
3.2.6	Aroclor 1254 im EROD-Assay .....	56
3.2.7	Chinolin.....	62
3.2.8	2,3-Benzofuran.....	62
3.2.9	Sedimente .....	62
3.3	Acetylcholinesterase-Assay (AChE-Assay) .....	65
3.3.1	Acetylcholinesterase-Assay mit Paraoxon-methyl.....	65
3.3.2	Acetylcholinesterase-Hemmung durch ausgewählte Monosubstanzen .....	66
3.3.3	Acetylcholinesterase-Assay mit Sedimentextrakten .....	68
3.3.4	Dotierung des Sedimentextrakts aus dem Verringkanal mit Chlorpyrifos.....	70
DISKUSSION .....		71
4.1	FET .....	71
4.1.1	EC <sub>10</sub> -Werte als Testkonzentration zur Bestimmung spezifischer Toxizität.....	71
4.1.2	Methylquecksilberchlorid.....	71
4.1.3	Chlorpyrifos .....	72
4.1.4	Bisphenol A.....	73
4.1.5	Aroclor 1254 .....	74
4.1.6	Chinolin.....	75
4.1.7	2,3-Benzofuran.....	76

4.1.8	Sedimentextrakte .....	77
4.2	Live-Imaging-EROD-Assay .....	78
4.2.1	CYP1-Induktion während der embryonalen Entwicklung .....	78
4.2.2	Zeitabhängiges EROD-Induktionspotential .....	79
4.2.3	Live-Imaging-EROD-Assay mit Monosubstanzen .....	80
4.2.4	Live-Imaging-EROD-Assay mit Sedimentextrakten .....	85
4.3	Acetylcholinesterase – Assay.....	87
4.3.1	EC <sub>10</sub> -Ermittlung von Paraoxon-methyl .....	87
4.3.2	Acetylcholinesterase-Hemmung durch ausgewählte Monosubstanzen .....	87
4.3.3	Acetylcholinesterase-Assay mit Sedimentextrakten .....	88
SCHLUSSFOLGERUNG .....		90
LITERATUR.....		93
ANHANG.....		109
5.1	Tabellarischer Überblick über die gesamten Testsubstanzen .....	109



## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde überprüft, inwiefern der Fischembryotest (FET) als Werkzeug zur Bestimmung von spezifischer Toxizität in Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) dienen kann. Als spezifische Endpunkte wurden dioxinähnliche Wirkung mithilfe des modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays und Neurotoxizität mittels des Acetylcholinesterase-Assays untersucht. Diese Assays wurden jeweils mit einem Satz ausgewählter Chemikalien geprüft, die aufgrund ihrer Relevanz für die europäische Wasserrahmenrichtlinie ausgewählt wurden: Methylquecksilberchlorid, Chlorpyrifos, Aroclor 1254, 2,3-Benzofuran, Chinolin, Bisphenol A sowie Paraoxon-methyl (für neurotoxikologische Effekte) und eine Reihe von Sedimenten von Standorten mit bekanntem ökotoxikologischen Hintergrund: Altrip und Ehrenbreitstein am Rhein sowie der Veringkanal im Hamburger Hafen. Um die spezifische Toxizität zu untersuchen und schädliche Wirkungen durch akute Toxizität zu vermeiden, wurde zuerst die Effektkonzentration von 10 % ( $EC_{10}$ ) bestimmt. Hierbei zeigte sich mit fortschreitender Belastungsdauer, dass mit steigendem  $\log K_{ow}$  die Diffusionsrate ab- und die Akkumulationsrate zunahm. Eine Akkumulation von Substanzen mit einem hohen  $\log K_{ow}$  war zum einen mit einer verzögerten Toxizität, zum anderen bei verlängerter Exposition durchaus mit gesteigerter Toxizität verbunden. Neben Teratogenität wurde auch die Bioaktivierung über CYP1A mit einer in dieser Arbeit entwickelten Kombinationsexposition untersucht. Eine gleichzeitige Exposition gegenüber Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon führten zu einer 40 %igen Steigerung der Toxizität gegenüber Chlorpyrifos als Monosubstanz.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung und Optimierung eines modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays. Die Auswertung des Assays über verschiedene Entwicklungsstufen hinweg (24, 48, 72, 96 und 120 h) zeigte, dass erst Embryonen mit einer funktionsfähigen Leber ( $\geq 72$  h) und nach  $\beta$ -Naphthoflavon-Stimulation ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Leber zeigten, dass nach 96 und 120 h dosisabhängig über die Zunahme von Resorufin im Gastrointestinaltrakt abgebildet werden konnte. Nach diesen Ergebnissen sind 96 und 120 h alte Embryonen die geeigneten Entwicklungsstadien, um die EROD-Aktivität *in vivo* mithilfe des Live-Imaging-EROD-Assays zu ermitteln. Eine Reduktion der Expositionszeit auf 3 h führte zu einem schnellen, effizienten und einfach handzuhabendem Assay. Die Kombinationsexposition mit Induktoren ermöglichte, erstmals *in vivo* das gleichzeitige Vorkommen von Agonisten und Inhibitoren von CYP1A in komplexen Umweltproben im Embryo darzustellen und ließ somit die Untersuchung der Rolle der CYP1A-Hemmung in Bezug auf die Toxizität zu. Eine geeignete Bildauswertungssoftware erlaubt schließlich eine Quantifizierung und anschließend eine statistische Auswertung der EROD-Induktion, was seinerseits zu einer Vergleichbarkeit sowie einer erhöhten Akzeptanz des modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays beiträgt.

Der modifizierte Acetylcholinesterase-Assay mit den Embryonen des Zebraärlings erwies sich als ein geeignetes Werkzeug zum Nachweis der neurotoxischen Wirkungen bestimmter Substanzklassen sowie auch komplexer Umweltproben. Die vorliegende Studie belegt dabei auch, dass PAKs in komplexen Umweltproben zur AChE-Hemmung beitragen können. Embryonen des Zebraärlings können ein geeignetes Modell zur Untersuchung neurotoxischer Wirkungen darstellen.

## ABSTRACT

The present thesis was designed to study the applicability of the fish embryo toxicity test (FET) as a tool for the detection of specific toxicity in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Dioxin-like toxicity detected by the live-imaging EROD assay and neurotoxicity detected by the acetylcholinesterase assay were used as specific endpoints. These assays were carried out with a set of substances which were selected for their relevance in the European Water Framework Directive: methyl mercury chloride, chlorpyrifos, Aroclor 1254, 2,3-benzofuran, quinolone, bisphenol A, as well as paraoxon-methyl for neurotoxicity screening, and a variety of sediment extracts from locations with a known ecotoxicological background: Altrip and Ehrenbreitstein on the Rhine river and the Vering Canal in Hamburg harbor.

To exclude interference with acute toxicity in the detection of specific toxicity, 10 % effect concentrations ( $EC_{10}$ ) were determined prior and used as maximum test concentration in the experiments. With increasing exposure duration and increasing  $\log P_{ow}$  diffusion rates decreased, whereas accumulation rates increased. On the one hand, the accumulation of substances with a high  $\log P_{ow}$  was associated with delayed toxicity; on the other hand, however, with increasing exposure time, there was a link to increased toxicity. Beside teratogenicity, bioactivation through CYP1A was investigated in a co-exposure scenario: thus, e.g., a simultaneous exposure to chlorpyrifos and  $\beta$ -naphthoflavone led to an increase in toxicity by 40 %, if compared to the toxicity of chlorpyrifos as monosubstance.

One major focusses was the development and optimization of the modified live imaging EROD assay: Experiments with different developmental stages (24, 48, 72, 96 and 120 h) documented that only embryos with a functional liver ( $\geq 72$  h) and after stimulation with  $\beta$ -naphthoflavone give a significant fluorescence signal, as visualized by a dose-dependent increase of resorufin generated in the gastrointestinal tract after 96 and 120 h. 96 and 120 h old embryos can thus be recommended as suitable developmental stages to detect *in vivo* EROD activity in the live-imaging EROD assay. The reduction of exposure time to 3 h resulted in a quick, efficient and manageable assay. Co-exposure with an inducer such as  $\beta$ -naphthoflavone allows demonstrating the effects of simultaneously occurring agonists and inhibitors on CYP1A; such combinations consistently occur in complex environmental samples. Densitometric analyses allow quantification and subsequent statistical assessment and can, therefore, add to a larger acceptance of the modified live-imaging EROD assay.

The modified acetylcholinesterase assay proved to be a useful tool for the detection of neurotoxic effects of certain classes of chemicals such as organophosphorus pesticide and carbamates as well as complex environmental samples in early developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*). However, the present study also shows that PAHs can add to the inhibition of AChE. Overall, the thesis demonstrates that zebrafish embryos are an appropriate model for the detection of neurotoxicity.

## EINLEITUNG

### 1.1 Historischer Hintergrund des Fischembryotests

Die aquatische Toxikologie beschäftigt sich mit der qualitativen und quantitativen Untersuchung von beeinträchtigenden bzw. toxischen Wirkungen von Chemikalien und Xenobiotika auf Wasserorganismen (Rand and Petrocelli, 1985). In der Vergangenheit wurden Fische schon seit langem für die Bewertung der akuten und chronischen Toxizität verwendet und wurden im Laufe der Zeit von der Wissenschaft, den Regulierungsbehörden sowie von der chemischen Industrie immer mehr als Vertreter der Vertebraten in der aquatischen Umwelt akzeptiert.

Die Europäische Chemikalienverordnung REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals) erfordert die Prüfung von Chemikalien und Abwässern, um ihre Sicherheit für Mensch und Umwelt sicherzustellen (Jeffries et al., 2014). Regulatorische und internationale Normungs- und Standardisierungsorganisationen, z.B. die US-amerikanische Umweltschutzbehörde (USEPA) und die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), haben Richtlinien zur Bewertung der akuten und chronischen Toxizität von Chemikalien und Abwässern zu Fischen entwickelt (EPA, 2002; Halder et al., 2010; OECD, 1992, 2013). Gemäß den Vorgaben von REACH muss die Toxizität von voraussichtlich 68.000 bis 101.000 Chemikalien bewertet werden, und diese Bewertungen werden vermutlich fast eine Million Fische benötigen, um die erforderlichen akuten und chronischen Toxizitätstests durchzuführen wie z.B. OECD-Tests 203, 210, 212 und 215 (Rovida and Hartung, 2009). Zusätzlich zu dieser steigenden Nachfrage sind die ethischen Bedenken gestiegen, da Fische, die einer akut toxischen Konzentration von Chemikalien ausgesetzt sind, unter Stress und Schmerzen leiden, was mit den geltenden Tierschutzgesetzen nicht vereinbar ist und den Einsatz alternativer Methoden für chemische Tests erfordert (ECHA, 2012). Die Idee, Tierversuche durch alternative Testmethoden zu reduzieren, zu verfeinern bzw. empfindlicher zu machen und zu ersetzen, wurde bereits von Russell and Burch (1959) formuliert.

In Anbetracht der Tatsache, dass die noch über den Dottersack ernährenden Entwicklungsstadien von Fischen gemäß der geltenden europäischen Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (EU, 2010) nicht als geschützt eingestuft werden (Strähle et al., 2012), wurde der Fischembryotest (FET) mit dem Zebraäbrbling (*Danio rerio*) wiederholt als eine vielversprechende Alternative für den akuten Fischtoxizitätstest vorgeschlagen (Braunbeck et al., 2005; Braunbeck et al., 2015; Görge and Nagel, 1990; Lange et al., 1995; Nagel, 2002; Nagel and Isberner, 1998) und schließlich als OECD TG 236 (OECD, 2013) verabschiedet. Insbesondere der Fischembryotest mit dem Zebraäbrbling eignet sich zur Vorhersage der akuten Fischtoxizität, da die Fischembryo-Mortalität eine hohe Korrelation mit dem akuten Fischtoxizitätstest aufzeigte (Belanger et al., 2013; Lammer et al., 2009).

Derzeit sind die Embryonen des Zebraäbrblings, die am häufigsten verwendeten Embryonen (Belanger et al., 2013), und die OECD-Validierungsstudie weist eine hohe Reproduzierbarkeit von akuten Toxizitätstests innerhalb eines Labors, aber auch zwischen unterschiedlichen Laboren auf (Busquet et al., 2014). Weitere Vorteile bei der Verwendung der Embryonen des Zebraäbrblings sind neben seiner hohen Fruchtbarkeit und seiner einfachen Pflege die völlige Transparenz und die schnelle Entwicklung, so dass 120 Stunden nach der Befruchtung das

Stadium der nur über den Dottersack ernährenden Larve bereits endet. Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit, Hochdurchsatz-Analysen durchzuführen und werden bereits als Screening-Modell in verschiedenen Anwendungen eingesetzt (Strähle et al., 2012).

## 1.2 Die Rolle des Chorions im Fischembryotest

Der Text des folgenden Abschnitts 1.2 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2013, „*DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET)*“. Aquat Toxicol 2013; 140-141: 229-238 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Obwohl Lammer et al. (2009) und Belanger et al. (2013) eine exzellente Korrelation zwischen Daten über akute Toxizität der Fische und dem Fischembryotest für mehr als 100 Substanzen nachweisen konnten, wurde eine geringe Anzahl von Substanzen identifiziert, die sich in Bezug auf die Toxizität im Embryo von der Toxizität im adulten Fisch signifikant unterschieden. Einige Verbindungen wiesen z.B. eine schwache akute Toxizität im Fischembryo auf (Klüver et al., 2015). Hierfür gibt es unterschiedliche Annahmen, z.B. könnte eine niedrigere Toxizität im Fischembryotest durch eingeschränkten Stoffwechsel (Klüver et al., 2015; Knöbel et al., 2012), durch instabile Expositionskonzentrationen (Knöbel et al., 2012) oder durch verminderte Aufnahme der Substanzen aufgrund ihrer hohen Lipophilie (Berghmans et al., 2008; van Leeuwen et al., 1985) vorliegen.

Das Chorion wurde wiederholt als potentielle Barriere für die Aufnahme chemischer Substanzen diskutiert. Tatsächlich wurde im Chorion verschiedener Arten von Teleostern die Ansammlung von Schwermetallen dokumentiert (Stouthart et al., 1994; van Leeuwen et al., 1985; Wedemeyer, 1968). Abgesehen von kationischen Polymeren wie Luviquat HM552 (Molekulargewicht bis 40.000) wurde jedoch eher die Barrierefunktion des Chorions für organische Verbindungen vermutet (Henn and Braunbeck, 2011). Ob das Chorion eine wirksame Barriere darstellt und somit den Embryo vor Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien schützt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Angesichts des Risikos von falsch negativen Ergebnissen bei Toxizitätsprüfungen aufgrund von einer evtl. Barrierefunktion des Chorions, müssen Wechselwirkungen zwischen Xenobiotika und dem Chorion systematisch untersucht werden.

Das Chorion des Zebraärbings ist eine ca. 1,5 - 2,5  $\mu\text{m}$  dicke azelluläre Hülle. Rawson et al. (2000) untersuchten die Struktur des Chorions von *Danio rerio* mithilfe von Feldemissions- und Rastertransmissionselektronenmikroskopie und postulierte, dass der Chorionmembran-Komplex aus drei Schichten besteht: Die mittlere und innere Schicht ist durchzogen von zylinderförmigen Porenkanälen, die eine Wand mit Korkenzieher ähnlich geringelten Lamellen aufweist. Angesichts des engen Durchmessers der Poren und der negativen Ladung des Chorions (Bodewein et al., 2016) wird vermutet, dass diese die Aufnahme von Verbindungen aufgrund ihrer Größe (Pelka et al., 2017) und/oder Ladungspotentials beschränken. Die makromolekulare Zusammensetzung des Chorions vom Zebraärbing wurde von Bonsignorio et al. (1996) analysiert. Die Analyse des isolierten und aufgereinigten Chorions besteht hauptsächlich aus vier Polypeptiden. Zwei von ihnen sind Glykoproteine, die mit Stickstoff verknüpft sind, und ähneln in ihrer Struktur Kollagen, Gelatine und Fibronektin (Lee et al., 2005). Die anderen sind nicht glykosyliert (Bonsignorio et al., 1996).

### 1.3 Lösungsmittel: DMSO im Fischembryotest

Der Text des folgenden Abschnitts 1.3 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2013, „*DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET)*“ Aquat Toxicol 2013; 140-141: 229-238 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Ein häufiges Problem bei Toxizitätstests mit Chemikalien ist die oft geringe Wasserlöslichkeit der Testsubstanzen. Die gelöste Konzentration einer Substanz stellt allerdings die treibende Kraft für die Aufnahme aus wässrigem Medium dar (ECETOC, 1996). Daher sind häufig Lösungsvermittler erforderlich, um die Testsubstanz zu lösen und somit die biologische Verfügbarkeit zu erhöhen und angemessene Expositionskonzentrationen zu gewährleisten (Hutchinson et al., 2006). Nach Helmstetter et al. (1996) besteht der Zweck eines chemischen Trägers darin, die erforderliche physikalische und / oder chemische Umgebung bereitzustellen, die notwendig ist, um eine Testsubstanz an einen Testorganismus zu liefern. Allerdings ohne irgendeine Nebenvariabel, wie strukturelle Veränderung der Testsubstanz oder nachteilige biologische Wirkungen durch den Träger selbst, zu induzieren.

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein häufig verwendetes Lösungsmittel im Fischembryotest, da es im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln mehrere Vorteile bietet: (1) DMSO zeigt eine sehr geringe Toxizität (LC<sub>10</sub>: 30 g/L wurde bei der Validierung des FETs durch die OECD ermittelt); (2) DMSO unterstützt nicht das Wachstum von Bakterien und Pilzen in aquatischen Testsystemen; (3) DMSO hat die Fähigkeit, biologische Membranen zu durchdringen, ohne deren strukturelle Integrität zu beschädigen (Rammler and Zaffaroni, 1967). Helmstetter and Alden (1995) z.B. verwendeten DMSO als Trägerlösungsmittel, um dem entstehenden Embryo über die Eizelle der Medaka (*Oryzias latipes*) Testchemikalien zuzuführen. Ebenso entwickelten Maccubbin and Black (1986) ein Protokoll für die direkte Exposition von DMSO-toxischen Mischungen an die Oberfläche von Eiern der Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*).

Basierend auf der Beobachtung einer erleichterten Aufnahme und den weithin bekannten Membran-Penetrationseigenschaften von DMSO, wurde die Hypothese, ob Chemikalien durch DMSO leichter durch das Chorion diffundieren, von Kais et al. (2013) überprüft. Da auch für die vorliegende Arbeit relativ hohe DMSO Konzentrationen verwendet werden mussten, soll im Folgenden die Studie von Kais et al. (2013) kurz erläutert werden: Es wurden Fluoreszenzfarbstoffe mit einer begrenzten Wasserlöslichkeit verwendet: Fluorescein (P<sub>ow</sub> 3.4) und 2,7-Dichlorfluorescein (P<sub>ow</sub> 4.7). Ziel der Studie war es, mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe die Aufnahme in das Ei sowie die Akkumulation im Embryo des Zebraäbrblings abhängig von verschiedenen DMSO Konzentrationen zu visualisieren. Die Verteilung von Fluorescein innerhalb der Eikompartimente variierte mit der DMSO-Konzentration. Bei der Verwendung der niedrigsten DMSO Konzentration von 0,01 % ging Fluorescein nicht durch das Chorion. Steigerte man allerdings die Konzentration von DMSO auf 0,1%, diffundierte Fluorescein zunehmend über das Chorion in den Perivitellinraum. Im Gegensatz dazu war die Aufnahme von 2,7-Dichlorfluorescein bei steigender DMSO-Konzentration nicht wesentlich erhöht und deutet auf andere stärkere toxikokinetische Prozesse hin, die nicht durch Lösungsmittelzugabe kompensiert werden konnten.

In Bezug auf den Fischembryotest zeigen die Ergebnisse, dass DMSO ohne Komplikationen als Lösungsmittel verwendet werden kann, allerdings sollte man möglichst bei einer maximalen Konzentration von 0,01% (0,1 ml/L), wie bereits im OECD-Guideline für schwierige Substanzen angegeben (OECD, 2000), bleiben. Ist man gezwungen doch höhere

Konzentrationen zu verwenden, wie in der vorliegenden Studie, sollte man die gesteigerte Membranpermeabilität sowie die gesteigerte Expositionskonzentration im Perivitellinraum berücksichtigen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für eine bessere Vergleichbarkeit bei jedem Expositionsszenario die gleiche DMSO-Konzentration verwendet.

#### 1.4 Die Notwendigkeit der EC<sub>10</sub> Bestimmung

Auf der einen Seite ist der FET ein leistungsfähiges Instrument zur Erkennung akuter Toxizität und erleichtert einem, mittels „Range-finding Tests“ gemäß der OECD-Prüfrichtlinie Nr. 236 (OECD, 2013) die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen zu finden; auf der anderen Seite bietet der FET die Möglichkeit, spezifische Toxizität in Embryonen des Zebrafisches abzubilden, z.B. Teratogenität, dioxinähnliche Toxizität sowie auch Neurotoxizität.

Um die spezifische Toxizität zu untersuchen und schädliche Wirkungen durch akute Toxizität zu vermeiden, wurde die Effektkonzentration von 10 % (EC<sub>10</sub>) bestimmt. Der EC<sub>10</sub> ist die Konzentration, bei der 10 % der Testindividuen einen Effekt zeigen. Die systematische Analyse verschiedener Konzentrationen ausgewählter Monosubstanzen und Sedimentextrakte (Siehe Kapitel 3.1) ermöglicht die Identifizierung von spezifischen Mechanismen und führen zu einem differenzierten Toxizitätsbild. Außerdem sind kurzzeitige Expositionen mit hohen Schadstoffkonzentrationen nur bei akuten Unfallszenarien (Nagel, 2002) von höherer Bedeutung, z.B. für Umweltverträglichkeitsprüfungen. Wohingegen niedrige Konzentrationen, wie die EC<sub>10</sub>-Konzentration, eine höhere Umweltrelevanz haben und die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse verringert und die Akzeptanz des FETs für regulatorische Anwendungen erhöht wird.

#### 1.5 Auswahl der Testsubstanzen

Der Text des folgenden Abschnitts 1.5 stammt aus dem Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (Danio rerio)*“, 318 S und wurde in Zusammenarbeit mit Keiter et al. (2013) geschrieben:

„Die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) schreibt als zu erreichendes Qualitätsziel den guten ökologischen Zustand von Gewässern bis 2015 vor. Die Sedimenttoxikologie spielt bei diesen Bestrebungen eine entscheidende Rolle, da gerade Schwebstoffe und Sedimente als sekundäre Quellen für partikulär gebundene Schadstoffe eine große Bedeutung haben (Förstner, 2008; Hollert et al., 2007; Netzband et al., 2007). Durch die von der Europäischen Kommission veröffentlichte Tochterdirektive der WRRL wird nun das Monitoring der Sedimentqualität reguliert und deren Bedeutung für die Erreichung des „guten ökologischen Zustandes“ hervorgehoben. Vergangene Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Liste der prioritären Schadstoffe aufgrund der geänderten Schadstoffspektren ständig fortgeschrieben werden muss und biologische Wirktests sowie wirkungsorientierte Analytik in der Wasserforschung unbedingt weiterentwickelt werden müssen (Hollert et al., 2009a). Daher sind Testverfahren notwendig, die eine Abschätzung der von diesen Chemikalien ausgehenden Umweltgefährdung ermöglichen und deren potenzielle Mobilisierung aus Sedimenten und Schwebstoffen eingehend untersuchen.“ Wasserbasierte Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit neigen dazu, sich an freischwimmende Partikel zu adsorbieren, die sich dann in Sedimenten von

Süßwasser- und Meeresökosystemen ablagern können (Wölz et al., 2010a; Wölz et al., 2010b). Sedimente können daher einen Großteil der Chemikalien beherbergen, darunter prioritäre Schadstoffe wie PAKs, PCBs und Dioxine.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes DanTox durchgeführt, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wurde und sich auf die Etablierung von Methoden mit spezifischen Wirkmechanismen bei embryonalen und larvalen Entwicklungsstadien des Zebrafisches konzentriert (Keiter et al., 2010a, 2010b). Die für diese Batterie als geeignet erachteten Methoden wurden mit einem Satz einzelner chemischer Stoffe validiert, die aufgrund ihrer Relevanz für die europäische Wasserrahmenrichtlinie ausgewählt wurden:

- Methylquecksilberchlorid,
- Chlorpyrifos,
- Aroclor 1254,
- 2,3-Benzofuran,
- Chinolin,
- Bisphenol A sowie
- Paraoxon-methyl (für den neurotoxikologischen Test)

und eine Reihe von Sedimenten von Standorten mit bekanntem ökotoxikologischen Hintergrund:

- Altrip und Ehrenbreitstein am Rhein und
- dem Veringkanal im Hamburger Hafen.

## 1.6 Teratogenität und Bioaktivierung von Xenobiotika in Fischembryonen

Toxizitäts- und Teratogenitätsstudien unter Verwendung von Embryonen des Zebrafisches wurden bereits seit Jahrzehnten durchgeführt (Dave, 1984; Dave and Xiu, 1991; Groth et al., 1994; Groth et al., 1993; Herrmann, 1993; Laale, 1977; Lange et al., 1995; Nagel, 2002; van Leeuwen et al., 1985) und resultierten letztendlich in einer der am besten untersuchten Fischart mit einem vollständig sequenzierten Genom und einem somit hervorragenden Modell für Teratogenitätstests (Berry et al., 2007; Brannen et al., 2010; Busch et al., 2011; Carney et al., 2006; McGrath and Li, 2008; Nelson et al., 2010; Selderslaghs et al., 2012; Selderslaghs et al., 2009; Teraoka et al., 2003; Van den Bulck et al., 2011; Weigt et al., 2011; Yang et al., 2009).

Die Beurteilung der Teratogenität erfordert neben niedrigen Konzentrationen, wie EC<sub>10</sub>-Konzentrationen, auch die Verwendung zusätzlicher Endpunkte, z.B. Fehlbildungen der Chorda, des Schwanzes, des Kopfes und/oder des Kiefers sowie Bildung von Ödemen, Verformungen des Dottersacks, verzögerter Schlupf oder allgemeine Wachstumsverzögerungen. Bei den meisten Chemikalien führt die Biotransformation zu einer Entgiftung bzw. zu weniger toxischen Metaboliten. In einigen Fällen können jedoch durch die Biotransformation Metabolite mit einer höheren Toxizität entstehen. Diesen Prozess bezeichnet man als Bioaktivierung. Eine besondere Bedeutung bei der Biotransformation kommt dem

mikrosomalen (im glatten endoplasmatischen Retikulum befindlichen) Cytochrome P450 (CYP) zu. Die meisten Studien dokumentieren das Vorhandensein verschiedener Cytochrom-P450-Isoformen im Zebrafisch mit einer insgesamt geringeren Biotransformationsfähigkeit als bei Säugetieren (Alderton et al., 2010). Weigt et al. (2010; 2009; 2008) konnten zeigen, dass eine Supplementierung von Embryonen des Zebrafisches durch induzierte Rattenlebermikrosomen die Teratogenität des Proteratogens Trimethadion sich signifikant erhöhte. Weiterführende Untersuchungen von Weigt et al. (2011) zur Aktivierung von zehn bekannten Proteratogenen führten zu dem Schluss, dass Embryonen des Zebrafisches die meisten proteratogenen Substanzen ohne die Zugabe eines exogenen metabolischen Aktivierungssystems aktivieren konnten.

Bezüglich der Teratogenität ist also die genaue Untersuchung der Bioaktivierung der Testchemikalien über Cytochrom P450 von großer Bedeutung. Insbesondere spielt die Induktion von Cytochrom P450 1A, einer der am besten untersuchten Biomarker für Umweltkontamination in aquatischen Ökosystemen, eine besondere Rolle. Inwiefern allerdings CYP 1A bei der Verursachung von Toxizität selbst beteiligt ist, bleibt weiterhin ungeklärt und wird sehr kontrovers diskutiert. Einerseits haben mehrere Studien gezeigt, dass durch die chemische Hemmung von CYP1A oder durch den direkten Protein-Knockdown die Toxizität entweder abnimmt (Cantrell et al., 1996; Dong et al., 2002) oder sich im Laufe der Entwicklung des Zebrafisches nicht verändert (Carney et al., 2004). Auf der anderen Seite deuten Studien darauf hin, dass CYP1A eine adaptive, schützende Antwort ist und somit den sich entwickelnden Wirbeltierembryo schützt (Billiard et al., 2006; Mattingly and Toscano, 2001). Der Nachweis eines funktionierenden CYP-Systems kann über die Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität erfolgen.

## 1.7 Die EROD-Aktivität als Biomarker im Fischembryotest

Der Text des folgenden Abschnitts 1.7 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*“ *Sci Total Environ*; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Ziel der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) Aktivitäts Messung ist es, in einer komplexen Umweltprobe (wie z.B. Sedimentextrakten) dioxinähnliche Substanzen nachzuweisen. Dioxinähnliche Substanzen weisen z.T. eine gleiche räumliche, coplanare Struktur auf und besitzen die Fähigkeit, an den Arylhydrocarbon (Ah)-Rezeptor zu binden. AhR-Liganden ähneln mit ihrer coplanaren Struktur umweltrelevanten Schadstoffen wie u.a. Polychlorierten Biphenylen (PCBs) und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) sowie strukturell verwandten Verbindungen (Fent, 2001; Segner and Cravedi, 2001; Whyte et al., 2000). Durch die Bindung an den Ah-Rezeptor werden Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYPs) neu gebildet, die eine wichtige ökotoxikologische Bedeutung bei Entgiftungsprozessen haben (Abb. 1).

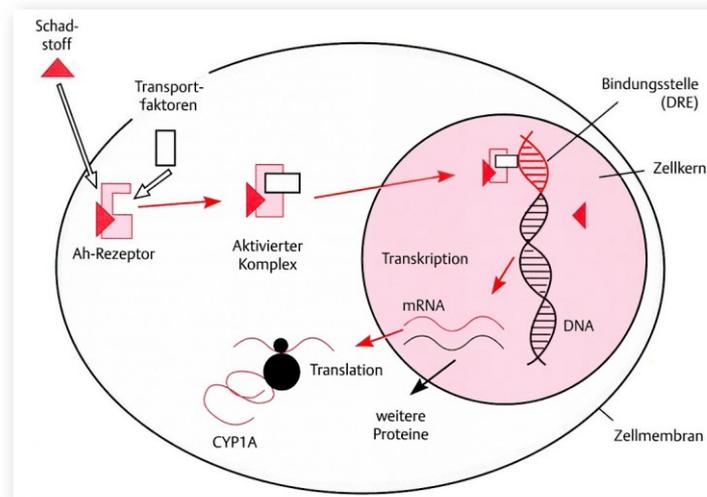


Abb. 1: Wirkmechanismus von potentiellen AhR-Liganden an den Ah-Rezeptor im Cytosol der Zelle. Nach Fent (2003): „bindet der Umweltschadstoff an den Ah-Rezeptor und aktiviert den Substrat-Rezeptor-Komplex, dieser wird mit Hilfe von Transportfaktoren in den Zellkern transferiert. Die Bindung dieses Komplexes an die Dioxin-Response Elements (DER) der DNA bewirkt schließlich die Expression einer Reihe von Genen. Die transkribierten mRNAs, welche ins Cytosol gelangen, führen u.a. zur Bildung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP1A), welche spezifisch neu gebildet werden“, Abbildung aus (Fent, 2003).

Die Anwesenheit dieser CYP-Enzyme kann durch Messung der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) Aktivität nachgewiesen werden, indem Ethoxyresorufin durch CYP1A in das fluoreszierende Resorufin umgewandelt wird (Abb. 2).

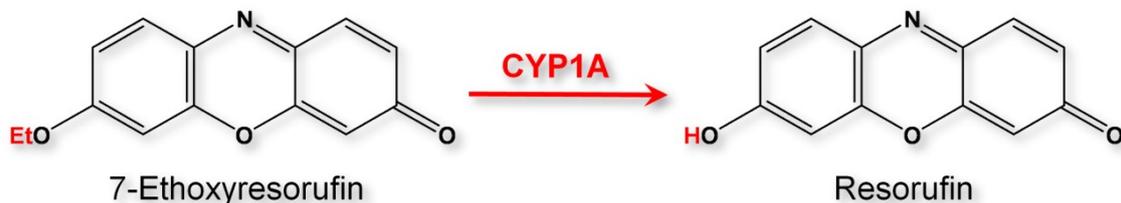


Abb. 2: Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin durch Cytochrome P4501A (7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase).

In Fischzellen ist die EROD-Aktivität ein bereits etablierter *In vitro*-Biomarker. Allerdings scheinen die Ergebnisse von *in vitro* Testsystemen mit Fischzelllinien die *in vivo* Toxizität häufig bis zu drei Größenordnungen zu unterschätzen (Tanneberger et al., 2013). Während die Ergebnisse von *in vitro* Testsystemen von Zellen auf den gesamten Organismus extrapoliert werden müssen und daher Probleme bei der Vorhersage der Toxizität verursachen können, spiegeln hingegen die *In vivo*-Assays die direkte Bioverfügbarkeit der Substanzen wider und haben somit eine höhere Relevanz für die ökotoxikologische Bewertung. Da die EROD-Aktivität bei Fischen hauptsächlich in der Leber gemessen wird, ermöglicht die Transparenz der Embryonen von Zebrafischn mit Hilfe von Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie, hochauflösende organspezifische EROD-Aktivitätsmessungen direkt in der Leber. Bisher wurden nur wenige Methoden entwickelt, die die Messung der EROD-Aktivität in intakten Fischen ermöglichten (González-Doncel et al., 2011; Le Bihanic et al., 2013; Nacci et al., 1998; Noury et al., 2006). Außerdem beschreiben mehrere Studien AhR-Agonisten, die die CYP1A-Aktivität in den sich entwickelnden Embryonen von z.B. Killifisch (*Fundulus heteroclitus*; Arzuaga et al., 2006; Nacci et al., 1998; Wassenberg and Di Giulio, 2004), Medaka (*Oryzias*

*latipes*; Carney et al., 2008) und Zebraquärling (*Danio rerio*; Liu et al., 2016; Otte et al., 2010) steigern. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den *In vivo*-EROD-Assay bzw. den Live-Imaging-EROD-Assay zu evaluieren und Fehlerquellen für den Nachweis der frühen CYP1A-Induktion in den Embryonen des Zebraquärlings zu identifizieren.

Aufgrund der Tatsache, dass CYP1A bei der normalen embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Choudhary et al., 2004) und um Fehlinterpretationen von EROD-Induktionen zu vermeiden, wurde eine Reihe von CYP1A-Messungen zwischen 24 und 120 h zum besseren Verständnis der basalen Induktionsmuster während der embryonalen Entwicklung durchgeführt. Unter diesem Gesichtspunkt wurden weitere Aspekte bezüglich der enzymatischen Aktivität von CYP1A während der Embryonalentwicklung bestimmt:

- das zeitliche Induktionsmuster,
- die geeignete Expositionsdauer und
- der Einfluss verschiedener Konzentrationen von den ausgewählten Monosubstanzen sowie von den drei unterschiedlichen Sedimentextrakten.

Eine Bewertung der Toxizität der Probe erfolgt zum einen durch einen Vergleich der Induktionsstärken mit der der Positivkontrolle (10 µg/L  $\beta$ -Naphthoflavon) und zum anderen mit der Durchführung eines Kombinationstests.  $\beta$ -Naphthoflavon ist ein synthetisches Flavonoid und starker Ah-Rezeptor-Agonist. Sein hohes Induktionspotential im EROD-Assay wird hier als Positivkontrolle genutzt und soll die herkömmliche Positivkontrolle 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ersetzen, da  $\beta$ -Naphthoflavon eine geringere Toxizität aufweist und somit leichter in einem Standardtest handelbar ist.

## 1.8 Die Rolle von inhibiertem CYP1A

Neben der gesteigerten EROD-Aktivität und mit dem damit verbundenen Mechanismus der Bioaktivierung, ist die Rolle von inhibiertem CYP1A bei der Embryonalentwicklung des Zebraquärlings ebenfalls ein interessanter Aspekt und weist zudem noch eine hohe ökologische Relevanz auf, da das gleichzeitige Auftreten von Agonisten und Inhibitoren von CYP1A typisch für komplexe Umweltproben sind (Wassenberg and Di Giulio, 2004). Die Bedeutung von inhibiertem CYP1A bei embryonalen Fehlentwicklungen ist noch weitgehend ungeklärt und benötigt weiterführende Untersuchungen. Um dieser Fragestellung näher zu kommen, wurde der Live-Imaging-EROD-Assay mit dem Zebraquärling modifiziert.

Einerseits wurde das induzierende EROD-Potential der ausgesuchten Einzelverbindungen getestet und andererseits wurden kombinierte Verbindungen mit dem AhR-Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon überprüft.  $\beta$ -Naphthoflavon induziert das CYP1A-Protein sowie auch die EROD-Aktivität ca. dreimal höher als das Signal der Negativkontrolle, der Basalinduktion (Troxel et al., 1997b). Ein Kombinationsversuch könnte die Möglichkeit bieten, eine spezifische Toxizität auf Cytochrom P4501A nachzuweisen.

Angenommen, eine erhöhte Toxizität wird durch eine Hemmung der CYP-Induktion ausgelöst, z.B. indem ein Metabolit sich kovalent an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet und dieses dadurch seine Funktionalität verliert, würde sich dies in einem Signal, das niedriger als das der Basalinduktion ist, spiegeln. Die Detoxifizierung über das CYP1A-System wäre gestört und es käme zu einer gesteigerten Toxizität im Organismus, die letztendlich dann auch

makroskopisch zu einem späteren Zeitpunkt zu erkennen wäre. Mithilfe von Kombinationsversuchen könnte man also in einem niedrigen Konzentrationsbereich ( $< EC_{10}$ ) sehr sensitiv eine Störung in der CYP1A-Aktivität frühzeitig erkennen. Außerdem könnten mithilfe des Kombinationstests auch umweltrelevante Substanzgemische mit ihren Metaboliten untersucht werden und Fehlinterpretationen aufgrund eines fehlenden Signals verhindert werden.

Für den Kombinationsversuch wurden die Monosubstanzen Chlorpyrifos (Thiophosphorsäureester, Insektizid) und Aroclor 1254 (polychloriertes Biphenyl, PCB) aus der Liste der prioritären Stoffe der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (EWRD) ausgewählt. Beide Substanzen haben eine geringe Wasserlöslichkeit, einen hohen Oktanol-Wasser-Koeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) und eine hohe Affinität zur Adsorption sowohl an gelöster organischer Substanz als auch an Partikeln.

Chlorpyrifos ist insofern eine sehr interessante Substanz für den kombinierten Expositionsversuch, da Chlorpyrifos erst durch Cytochrom P450 aktiviert werden muss, um seinen Wirkmechanismus, die Acetylcholinesterase zu hemmen, zu entfalten. Genauer gesagt, CYP1A wandelt Chlorpyrifos durch eine Desulfuration zu Chlorpyrifos-Oxon um (Straus et al., 2000; Wheelock et al., 2005). Erst dieser Metabolit hemmt die Acetylcholinesterase (Fukuto, 1990). Nach Fukuto (1990) und Tang et al. (2002) werden bei dieser Desulfuration Schwefelionen frei; diese binden an die Häm-Gruppe von CYP1A, das aktive Zentrum wird blockiert und das Enzym verliert seine Funktionalität. Durch das Wissen dieser spezifischen Reaktion stellt Chlorpyrifos eine adäquate Substanz dar, um den Live-Imaging-EROD-Assay in einer Kombinationsexposition zu evaluieren und zu prüfen.

Ebenfalls ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Handhabung dieses relativ neuen Assays sind Substanzen mit einer sehr geringen biologischen Abbaubarkeit in der Umwelt, definiert als persistente organische Schadstoffe (POP). PCBs wie Aroclor 1254 sind chemisch inert und haben eine Bodenhalbwertszeit von 940 Tagen (Hsieh, 1994). Sie zählen daher zu den POPs und spiegeln eine hohe Umweltrelevanz wider.

## 1.9 Anwendbarkeit des Live-Imaging-EROD-Assays für komplexe Umweltproben

Der Text des folgenden Abschnitts 1.9 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2015, „*Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments*“ Environ Sci Pollut Res Int 2015; 22: 16329-16339 und wurde in Zusammenarbeit mit Daniel Stengel im Original zu gleichen Anteilen gemeinsam geschrieben und von mir übersetzt.

Ein weiteres zentrales Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Anwendbarkeit des Live-Imaging-EROD-Assays für komplexe Umweltproben wie Sedimentextrakte zu überprüfen. Die meisten Studien zur Sedimenttoxizität verwendeten verschiedene Protokolle zur Extraktion der Schadstoffe aus der Partikelmatrix. Im Gegensatz zu nativen Sedimentproben, deren Wirkungen auf der natürlichen Bioverfügbarkeit von Substanzen beruhen, stellen Sedimentextrakte Werkzeuge dar, um im ungünstigsten Fall das vollständige integrierte toxische Potenzial von Chemikalien im Sediment zu identifizieren. Mithilfe von Soxhlet-Extraktionstechniken haben verschiedene Screening Programme in Süddeutschland das toxikologische Potenzial in Sedimentextrakten beispielsweise aus den Flüssen Rhein, Neckar und Donau untersucht (Braunbeck et al., 2009; Hollert et al., 2009b; Keiter et al., 2009).

Im Rahmen des DanTox-Projektes wurde eine Auswahl von unterschiedlichen belasteten Sedimenten aus Gebieten mit bekanntem chemischen und ökotoxikologischen Hintergrund verwendet:

- Altrip und Ehrenbreitstein am Rhein, als weniger stark belastete Standorte und
- der Veringkanal im Hamburger Hafen, als stärker belasteter Standort (Hafner et al., 2015).

Basierend auf routinemäßigen chemischen Analysen der deutschen Bundesanstalt für Gewässerkunde (Koblenz) stellen diese Umweltprobenentnahmestellen einen Gradienten hinsichtlich ihrer Belastung mit chemischen Kontaminanten dar:

### **Altrip < Ehrenbreitstein < Veringkanal.**

Die Zusammenarbeit mit der Universität Aachen ermöglichte uns zwei alternative *In vivo*-Ansätze zur Bestimmung der EROD Aktivität in Embryonen des Zebrafischs gegenüber acetonischen Sedimentextrakten, miteinander zu vergleichen:

- 1.) Der Live-Imaging-EROD-Assay zum Nachweis der EROD-Induktion direkt in der Leber mithilfe der Epifluoreszenzmikroskopie, wie oben beschrieben, und
- 2.) der Fischembryo EROD-Assay mit homogenisierten Zellen aus Embryonen des Zebrafischs nach einer *In-vivo*-Exposition (Schiwy et al., 2015).

Der modifizierte duale *In-vivo*-EROD-Assay bietet die Möglichkeit, potentielle additive und inhibitorische Wechselwirkungen selektiv durch komplexe Umweltgemische zu analysieren, wodurch das Risiko von Fehlinterpretationen toxischer Potentiale deutlich reduziert werden kann (für weiterführende Informationen, s. Kais et al., 2017).

## 1.10 Der Nachweis von neurotoxischen Substanzen mit dem AChE-Assay

Der Text des folgenden Abschnitts 1.10 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2015, „*Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments*“ Environ Sci Pollut Res Int 2015; 22: 16329-16339 und wurde in Zusammenarbeit mit Daniel Stengel im Original zu gleichen Anteilen gemeinsam geschrieben und von mir übersetzt.

Neben der Dioxin-ähnlichen Toxizität soll in der vorliegenden Arbeit ebenfalls überprüft werden, ob auch andere spezifische Wirkmechanismen mit dem Fischembryotest nachzuweisen sind. Daten zur Neurotoxizität sind in aquatischen Ökosystemen nach wie vor rar. Eine spezifische Art der neurotoxischen Wirkung ist jedoch bei Fischen ziemlich gut dokumentiert worden: Die Hemmung des Enzyms: Acetylcholinesterase (AChE).

Acetylcholin (ACh), ein Neurotransmitter, spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im zentralen sowie im vegetativen Nervensystem. Acetylcholinesterase katalysiert die Umwandlung von Acetylcholin in Acetat und Cholin und führt zu einer Inaktivierung des Neurotransmitters (Abb. 3).

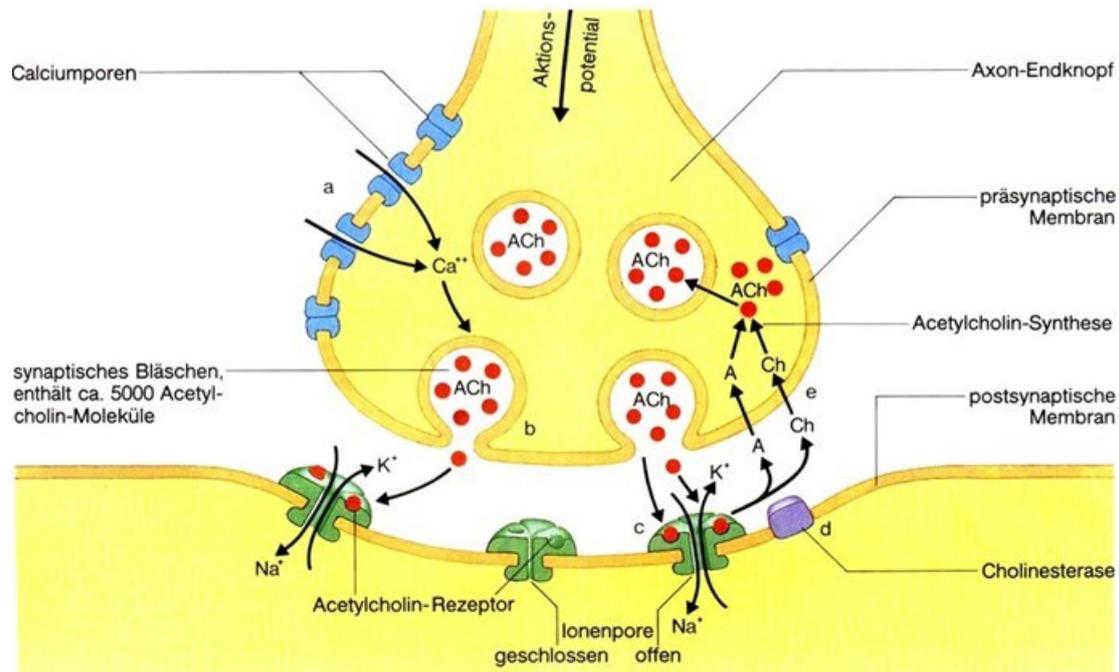


Abb. 3: Schema zur Übermittlung eines Nervenimpulses an einer cholinergen Synapse. Die Acetylcholinesterase spaltet den Transmitter Acetylcholin, sobald er den Acetylcholinrezeptor in der postsynaptischen Membran erreicht, sodass dieser für ein neues Acetylcholinmolekül erreichbar wird und die postsynaptische Membran weiterhin erregbar bleibt.<sup>1</sup>

Die Hemmung der AChE ist wichtig für die Entwicklung und den Einsatz einiger Pestizidarten. Die meisten Pestizide, wie Organophosphate oder Carbamate, binden kompetitiv an die aktive Stelle des Enzyms. Die kompetitive Bindung der Agonisten an das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase führt zur Akkumulation von Acetylcholin in dem synaptischen Spalt und damit zu einer Inaktivierung der Signaltransduktion über cholinerge Synapsen (Fulton and Key, 2001; Russom et al., 2014). Die Hemmung der Acetylcholinesterase wurde in großem Umfang als ein Biomarker der Neurotoxizität sowohl von reinen Substanzen als auch von Umweltproben in verschiedenen Modellorganismen und Geweben verwendet (Arufe et al., 2007; De Domenico et al., 2013; Dembélé et al., 2000; Fan et al., 2013; Humphrey and Klumpp, 2003; Jung et al., 2012; Kopecka-Pilarczyk and Correia, 2011; Monteiro et al., 2005; Oropesa et al., 2007; Perkins and Schlenk, 2000; Rodrigues et al., 2013; Wogram et al., 2001). Der Zebraabärbling erwies sich als zuverlässiges *In vivo*-Instrument zum Nachweis von Organophosphaten und Carbamaten (Hannemann, 1992; Küster, 2005; Küster and Altenburger, 2006, 2007).

Abgesehen von Carbamaten und Organophosphaten wurde gezeigt, dass Chemikalien aus anderen chemischen Klassen die Acetylcholinesterase-Aktivität durch potentielle Enzyminhibierung reduzieren kann, z.B. bestimmte polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs; Kang and Fang, 1997) oder Dioxine (Fan et al., 2013). Die enzymatische Acetylcholinesterase-Aktivität kann jedoch auch nach dem Abbau von cholinergen Neuronen z. B. durch Bisphenol A verändert werden (Miyagawa et al., 2007). Die Inhibition der Acetylcholinesterase-Aktivität kann aber auch durch synergistische (Chen et al., 2014), additive

<sup>1</sup> Abb.3 und die Bildunterschrift basiert auf den Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): „DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebraabärbling (*Danio rerio*)“, 318 S und wurde im Original von mir verfasst.

(Mwila et al., 2013) oder antagonistische Mechanismen (Perez et al., 2013) modifiziert werden. Infolgedessen ist anzunehmen, dass das breite Spektrum der in Sedimenten vorkommenden Chemikalien zu einer unvorhersehbaren Kombination von inhibitorischen und stimulierenden Effekten führen kann, was die experimentelle Bestimmung unumgänglich macht.

Die meisten zur Bestimmung der Acetylcholinesterase-Hemmung verwendeten Methoden beruhen auf dem Originalprotokoll von Ellman et al. (1961), welches dann von Guilhermino et al. (1996) für die Verwendung in Mikrotiterplatten adaptiert wurde. Da der Zebrafisch zu einem der wichtigsten Modellorganismen in der (Öko-) Toxikologie geworden ist, modifizierte Küster (2005) die Methode für die Verwendung von Embryonen des Zebrafisches und Perez et al. (2013) reduzierte die Anzahl der Embryonen pro Versuchsgruppe. Angesichts der beträchtlichen biologischen Variabilität innerhalb einer Gruppe von sich entwickelnden Embryonen (insbesondere von Wildtyp-Stämmen; Irmeler et al., 2004) besteht ein Bedarf an einen wissenschaftlich fundierten Kompromiss zwischen dem Tierschutz fundiertem Aspekt, die Anzahl der Individuen möglichst gering zu halten und dem Zweck des wissenschaftlichen Experiments, z.B. die genaue Identifizierung der niedrigsten beobachteten Effektkonzentration für die Acetylcholinesterase-Hemmung zu ermitteln.

Für jede Form von organ- und zellspezifischer Toxizität sollten auch Neurotoxizitätstests so ausgelegt werden, dass sie ausschließlich primäre neurotoxische Wirkungen zeigen. Hierzu spielt die Wahl der richtigen Konzentration ebenfalls eine entscheidende Rolle. Bei der Verwendung der immer noch weitverbreiteten  $EC_{50}$  Konzentration läuft man die Gefahr, eben keine spezifische Toxizität abzubilden, sondern auch in gewissen Maße die nicht-spezifischen sekundären Effekte abzubilden, die durch systemische zell- und organotoxischer zusammenhängender Wirkungen verursacht werden. Wie bereits oben in Abschnitt 1.4 erwähnt, wurden die Versuche in der vorliegenden Studie so konzipiert, dass sekundäre Effekte über die Verwendung der  $EC_{10}$  Konzentration von neuronalen Effekten möglichst ausgeschlossen wurden. Des Weiteren wurde das Protokoll für die Messung der Acetylcholinesterase-Hemmung in den frühen Entwicklungsstadien des Zebrafisches weiter optimiert, indem die Testkonzentrationen sogar unter dem ermittelten  $EC_{10}$ -Wert verwendet wurden.

In Vorversuchen zeigten die Embryonen des Zebrafisches nach einer Exposition mit Chlorpyrifos, einem bekannten AChE-Inhibitor, das typisch veränderte Verhaltensmuster, wie Verringerung der Schwimmaktivität und unkontrollierte Muskelzuckungen (Jin et al., 2015; Kienle et al., 2009; Levin et al., 2004). Aufgrund dieser Beobachtung eignete sich Chlorpyrifos hervorragend als Modellsubstanz zur Etablierung und Validierung des modifizierten Acetylcholinesterase-Assays. Um die Funktionalität des AChE-Assays zu überprüfen, wurden zusätzlich die oben erwähnten prioritären Schadstoffe, wie Aroclor 1254, 2,3-Benzofuran, Bisphenol A, Chlorpyrifos, Paraoxon-methyl, Chinolin und Methylquecksilberchlorid sowie auch die drei erwähnten Sedimentextrakte (Altrip, Ehrenbreitstein und Veringkanal) getestet.

Aufgrund des breiten Spektrums von Chemikalien in komplexen Umweltproben wie Sedimenten, stellt sich die gleiche Frage, wie bereits für den Live-Imaging-EROD-Assay: Auf welche Weise interferieren synergistische, additive oder antagonistische Mechanismen mit dem Acetylcholinesterase-Assay? Um potentielle Maskierungseffekte von Sedimentverbindungen, die evtl. Acetylcholinesterase hemmen, aufzuklären, wurden Extrakte des Veringkanals in einem Kombinationsexpositionsansatz mit dem bekannten AChE-Hemmer Chlorpyrifos versetzt (siehe Kapitel 3.3.43.33.4).

## 1.11 Allgemeine Ziele dieser Arbeit

Infolge der erhöhten Nachfrage durch die REACH-Gesetzgebung besteht in Bereichen der Ökotoxikologie ein erhöhter Bedarf an kostengünstigen Tiermodellen, die zusätzlich eine Möglichkeit von großangelegten Hochdurchsatz-Analysen bieten sollen. Der Fischembryotest mit dem Zebraquarienfisch ist ein solches Modell. Zu den Vorteilen des Fischembryotests mit dem Zebraquarienfisch gehören seine geringe Größe, die schnelle Entwicklung und das geringe Volumen der zu verbrauchenden Testsubstanz. Der Fischembryotest zeigt sich als ein geeigneter Ersatz für die Toxizitätsprüfung bei adulten Fischen (Lammer et al., 2009). Es bestehen allerdings immer noch Bedenken hinsichtlich der Einschränkungen bei der Anwendung und der Vorhersagekapazität für bestimmte Verbindungen. Insbesondere die spezifische Toxizität in den frühen Entwicklungsstadien des Zebraquarienfisches, wie AhR-vermittelte Toxizität und Neurotoxizität in den niedrigen Konzentrationen, erfordert weiterführende und eingehendere Untersuchungen. Ein erhöhter Aufklärungsbedarf besteht ebenfalls bei Substanzen, die unterschiedliche chemische Eigenschaften besitzen, wie Wasserlöslichkeit, Lipophilie, sterische Anordnung der Substituenten oder die Molekülgröße. Dies sind alles wichtige Parameter für die toxikokinetischen Prozesse. Aber auch synergistische, additive und inhibitorische Effekte von Substanzgemischen in komplexen Umweltgemischen, wie Sedimentextrakte, sollten weiterführend untersucht werden.

Daher werden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen detailliert behandelt:

- Auf welche Weise beeinflussen unterschiedliche Entwicklungsstadien des Zebraquarienfisches das Induktionsmuster der EROD-Aktivität? (Kapitel 3.2.1)
- Wie beeinflusst die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen das Induktionsmuster der EROD Aktivität? (Kapitel 3.2.4; 3.2.6 und 3.2.9)
- Wie wirkt sich eine verkürzte Expositionszeit auf das Induktionsmuster der EROD Aktivität aus? (Kapitel 3.2.2)
- Wie kann eine Hemmung der EROD-Aktivität erkannt werden? (Kapitel 3.2.4 und 3.2.6)
- Welche Konsequenzen hat ein inhibiertes Cytochrom P450-System für die Embryonalentwicklung im Expositionsversuch? (Kapitel 3.2.4 und 3.2.6)
- Ist der Live-Imaging-EROD-Assay ein geeignetes Instrument, um dioxinähnliche Substanzen in Sedimentextrakten nachzuweisen? (Kapitel 3.2.9)
- Ist der Acetylcholinesterase-Assay mit dem Zebraquarienfisch ein geeignetes Werkzeug, um neurotoxische Verbindungen zu identifizieren? (Kapitel 3.3)
- Kann man mithilfe des Acetylcholinesterase-Assays neurotoxische Substanzen auch in komplexen Umweltproben (Sedimentextrakten) nachweisen? (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4)

## MATERIALIEN & METHODEN

### 2.1 Der Fischembryo-Test und die EC<sub>10</sub>-Bestimmung

#### 2.1.1 Die Testsubstanzen

Der Text des folgenden Abschnitts 2.1.1 basiert auf den Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes *DanTox* (Keiter et al. 2013; BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebraärbling (Danio rerio)*“, 318 S und wurde im Original von mir geschrieben.

Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet und stammen, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland).

#### Methylquecksilberchlorid

Methylquecksilber (Abb. 4) ist eine metallorganische Verbindung aus Quecksilber und einer Methylgruppe und kann als einfach positiv geladenes Ion Verbindungen mit negativ geladenen Ionen, wie Chloridionen, eingehen. Es bildet sich in der Natur durch Biomethylierung und reichert sich in der Nahrungskette an. Organische Quecksilberverbindungen werden als stark wassergefährdend eingestuft (Wassergefährdungsklasse 3).

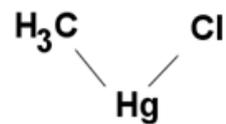


Abb. 4: Strukturformel von Methylquecksilberchlorid

#### Chlorpyrifos

Chlorpyrifos (Abb. 5), ein bekannter Thiophosphorsäureester, wird weltweit als Insektizid in der Landwirtschaft und Haushalten eingesetzt (Yen et al., 2011). Chlorpyrifos ist in fast 100 Ländern zugelassen und wird auf einer Fläche von ca. 8,5 Millionen Acre geschätzt (Giddings et al., 2014; Williams et al., 2014). Allein für China haben Liu et al. (2014) einen jährlichen Chlorpyrifos Verbrauch von etwa 18.000 t angegeben. Der Inlandsabsatz in Deutschland wurde 2005 mit unter 1 Tonne angegeben. Bis 2004 waren noch zwei chlorpyrifoshaltige Insektizide in Deutschland zugelassen. Infolgedessen wird Chlorpyrifos üblicherweise im Grundwasser überwacht und Oberflächenwasser (Kammerbauer and Moncada, 1998; Masiá et al., 2015; Zhang et al., 2012). Chlorpyrifos ist ein klassischer Inhibitor von Acetylcholinesterase (Barron and Woodburn, 1995; Richardson, 1995) und bekannt für seine neurologische Entwicklungstoxizität (Grandjean and Landrigan, 2006).

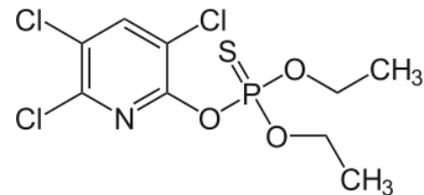


Abb. 5: Strukturformel von Chlorpyrifos

Chlorpyrifos hat einen hohen Oktanol-Wasser-Koeffizienten ( $K_{ow}$ ) von 4,96 bis 5,3 (GESTIS, 2006; Perkow and Ploss, 1999), ist nur schwer wasserlöslich (2 mg/L bei 20 °C) und muss in DMSO vorgelöst werden. DMSO-Konzentrationen sollten laut dem OECD Technical Guidance Paper for Difficult Substances 0,01 % in der Testlösung nicht überschreiten. Vortests zeigten allerdings, dass sich Chlorpyrifos mit 0,01 % DMSO nicht in Lösung halten lässt, sondern nur mit 0,1 % DMSO. Da DMSO-Konzentrationen von 0,1 und 1 % in den Testlösungen die

Aufnahme über das Chorion (Kais et al., 2013) erleichtern, muss die erhöhte Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden. Um diesen Effekt bei allen Konzentrationen gleich zu halten, wurden alle Testlösungen mit einer gleichen DMSO-Konzentration von 0,1 % DMSO angesetzt. Die maximale Löslichkeit wurde mithilfe eines Löslichkeitstests ermittelt und zeigte deutliche Unterschiede zu  $LC_{50}$ -Werten in der Literatur. Die Löslichkeitstests ergaben eine maximale Löslichkeit von 3 mg/L.

## Bisphenol A

Der Trivialname „Bisphenol“ bezeichnet die Gruppe der Diphenylalkane (Abb. 6). Das sind aromatische Kohlenwasserstoffe, die aus zwei Phenolringen bestehen, die mit Alkylgruppen verbunden sind. Bisphenol A dient v.a. als Ausgangsstoff zur Synthese von polymeren Kunststoffen, als Antioxidans in Weichmachern und zum Verhindern der Polymerisation in Polyvinylchlorid (PVC). Bisphenol A ist bekannt als ein endokriner Disruptor, d.h. er besitzt eine östrogene Wirkung. 2006 produzierte die chemische Industrie weltweit 3,8 Millionen Tonnen Bisphenol A. Auf die EU entfiel fast ein Drittel der Weltproduktion und auf Deutschland rund 70 % der europäischen Produktion (840.000 t; UBA, 2010). Bisphenol A ist schlecht wasserlöslich und hat einen  $\log K_{ow}$  zwischen 2,2-3,4 (Groshart et al., 2001). Die Stammlösung von Bisphenol A (500 mg/L) muss zunächst in Natriumhydroxid (pH 10 - 11) gelöst werden (Pickford et al., 2003) und wird dann weiter auf die Testlösungen verdünnt.

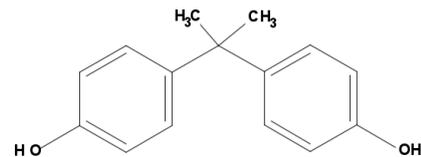


Abb. 6: Strukturformel für Bisphenol A.

## Aroclor 1254

Aroclor 1254 (Abb. 7) ist eine kommerzielle PCB-Mischung, die per Definition aus 12 Kohlenwasserstoffen, 54 % Chlor und aus über 80 PCB-Isomeren und Kongeneren besteht (Alvares et al., 1973; Kodavanti et al., 2001). Aroclor 1254 wurde hauptsächlich in den 1930-1970er Jahren weitgehend für industrielle Anwendungen, wie Hydraulikflüssigkeiten oder Weichmacher in Lacken, Isoliermitteln und Kunststoffen weltweit vermarktet und verwendet. PCBs zählen inzwischen

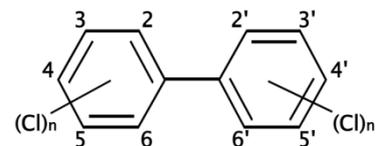


Abb. 7: Strukturformel für ein PCB, schematische Darstellung mit verschiedenen Chlorsubstituenten

zu den zwölf als „dreieckiges Dutzend“ bekannten organischen Giftstoffen, welche durch das Stockholmer Übereinkommen vom 22. Mai 2001 weltweit verboten wurden. PCBs haben sich überall auf der Erde ausgebreitet, sie sind in der Atmosphäre, den Gewässern und im Boden allgegenwärtig nachweisbar. Da es sich bei Aroclor 1254 nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Substanzgemisch handelt, haben sich für eine bessere Vergleichbarkeit die Verbundpartner der Universität Aachen und Heidelberg eine Lot.-Charge (LB77779V) von Aroclor 1254 geteilt. Aroclor 1254 weist einen noch höheren  $\log K_{ow}$  (6,79) als Chlorpyrifos und somit eine noch schlechtere Wasserlöslichkeit von 43  $\mu\text{g/L}$ , auf. Daher musste DMSO in einer höheren Konzentration von 0,2 % als Lösungsvermittler verwendet werden.

Aroclor 1254 ist in der Umwelt gegen Oxidation und Reduktion relativ stabil, so dass Aroclor 1254 auch als persistenter organischer Schadstoff (POP) eingruppiert wird (Porta and Zumeta, 2002). Aroclor 1254 hat eine Halbwertszeit im Boden von 940 Tagen (Hsieh, 1994) und führt zu einer Vielzahl von biologischen Effekten (Crinnion, 2011).

## Chinolin

Chinolin gehört zur Gruppe der Heteroaromaten. Es besteht aus zwei aromatischen, sechsgliedrigen Kohlenstoffringen, bei dem ein Kohlenstoffatom durch Stickstoff ersetzt ist (Abb. 8). Bei Standardbedingungen ist Chinolin flüssig, hat eine gute Wasserlöslichkeit von 6,11 g/L und der  $\log K_{ow}$  liegt bei 2,03. Chinolin wird nach GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) als akut toxisch und gewässergefährdend eingestuft und steht zudem im Verdacht krebserregend zu sein. In der Natur kommt es nur als Grundbaustein in Derivaten vor, z.B. in Chinin, das als natürliches Anti-Malariamittel verwendet wird. Chinolin selbst wird aus Steinkohlenteer hergestellt, in dem es zu 0,3 % enthalten ist (KORA, 2009/2010). Anwendung findet es vor allem als Grundstoff zur Herstellung von Medikamenten, Herbiziden und Fungiziden. Zu diesen Zwecken werden weltweit 2000 t/a davon produziert (Collin and Höke, 2005). In die Umwelt gelangt es vor allem durch Freisetzung während der Verarbeitung von Steinkohlenteer und Teeröl. So kann Chinolin über Einleitung und Versickerung in aquatische Ökosysteme gelangen.

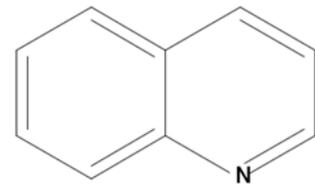


Abb. 8: Strukturformel für Chinolin.

## 2,3-Benzofuran

Bei 2,3-Benzofuran (Abb. 9) handelt es sich um einen planaren Heteroaromaten, der aus einem Furanring und einem anellierten Benzolring zusammengesetzt ist. 2,3-Benzofuran kommt in der Natur nicht vor, sondern entsteht bei der Herstellung von Steinkohlenteeröl aus Steinkohlenteer. Während der fraktionierten Destillation entstehen bei 167-184°C neben Teeröl kleine Mengen (< 10 %) 2,3-Benzofuran (ATSDR, 1992). 2,3-Benzofuran wird nicht als Reinsubstanz zum wirtschaftlichen Nutzen hergestellt, sondern entsteht als gelbes, süßlich riechendes, öliges Nebenprodukt, das nur schwer in Wasser löslich ist. Gemäß 67/548/EWG (1967) und 1999/45/EG (1999) steht 2,3-Benzofuran unter Verdacht krebserregend zu sein und gilt als schädlich für Wasserorganismen.

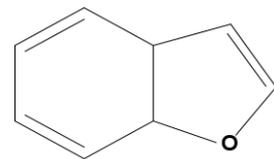


Abb. 9: Strukturformel von 2,3-Benzofuran

### 2.1.2 Sedimentaufbereitung und –charakterisierung

Der Text des folgenden Abschnitts 2.1.2 basiert auf den Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (Danio rerio)*“, 318 S und wurde in Zusammenarbeit mit Keiter et al. (2013) geschrieben.

Für das DanTox-Projekt wurden drei Sedimentproben mit unterschiedlich starker Belastung (gering, moderat und hoch belastet) auf Basis früherer Ergebnisse aus dem SeKT Projekt ausgewählt (Feiler et al., 2005). Die Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz (Dr. Ute Feiler und Dr. Georg Reifferscheid) konnte dafür gewonnen werden, das DanTox-Projekt als assoziierten Partner zu unterstützen. Die BfG hat u.a. für das Projekt die beiden Sedimentproben aus dem Rhein (Altrip und Ehrenbreitstein) zur Verfügung gestellt. Die Hamburger Hafenbehörde stellte dem DanTox-Projekt die Probe aus dem Veringkanal zur Verfügung. Die Sedimente aus dem Veringkanal sind aus früheren Untersuchungen, u.a. von der BfG, dafür bekannt, sehr hoch mit organischen Schadstoffen belastet zu sein. Die Parameter der Proben sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Sedimentparameter der DanTox-Proben.

	Altrip	Ehrenbreitstein	Veringkanal
Flusskilometer	417	591	-
Probenentnahmedatum	11.03.2010	11.03.2010	
Temperatur H <sub>2</sub> O/Sediment [°C]	3,7 / 3,8	4,3 / 4,3	-
pH-Wert H <sub>2</sub> O/Sediment	8,1/7,6	7,0/7,4	-
Leitfähigkeit (H <sub>2</sub> O) [mS/cm]	1,46	6,79	-
O <sub>2</sub> -Gehalt (H <sub>2</sub> O) [mg/L]	15,8	13,0	-
Redoxpotential (Sediment) [mV]	-236	-160	-
Relativer Wassergehalt [%]	69,7	63,7	73,9
Relatives Trockengewicht [%]	30,3	36,3	26,1

### Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung dient der Konservierung der Proben, um sie über einen längeren Zeitraum für verschiedene biologische und chemische Analyseverfahren sowie zur Extraktion nutzen zu können (Hollert et al., 2000). Vor der eigentlichen Gefriertrocknung wurde jede Probe in einen 250 ml Rundkolben überführt und für ca. 10 min. in einem Stickstoffbad rotiert. Das Sediment bildet dadurch einen dünnen Film auf der Glasoberfläche und damit die größtmögliche Fläche. In der Gefriertrocknungsanlage (Christ, Alpha 2-4 LD plus; Osterode) wurden die Sedimente mittels Sublimation je nach Wassergehalt für ca. 48 h getrocknet. Die Sedimente wurden anschließend durch Siebe (Analysesieb, 2 mm Weite, Retsch, Haan, Deutschland) von kleineren Zweigen und Steinen befreit und in Kunststoffgefäßen bei 4 °C im Kühlraum zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **Soxhlet- Extraktion**

Bei der organischen Extraktion werden an Partikel gebundene organische Verbindungen durch eine multiple Extraktion mittels eines organischen Lösungsmittels gewonnen und in eine gelöste Phase überführt (Ahlf, 1995; Erdinger et al., 2004; Seiler et al., 2008). Von jeder gefriergetrockneten Probe wurden 20 g in einer Extraktionshülse (200 ml; Schleicher & Schuell, Dassel) abgewogen, mit Glaswolle bedeckt und in eine Soxhlet-Apparatur überführt. Als Lösungsmittel wurde Aceton verwendet, das sich insbesondere durch eine hohe Extraktionsleistung bei gleichzeitig geringer Umweltschädlichkeit auszeichnet (Seiler et al., 2008). Während der Extraktion wird das in einem Kolben mit Siedeperlen teilweise verdampfte Aceton an einem Rückflusskühler wieder kondensiert, von dem es so lange auf die Probe tropft bis der Schenkel des Rückflussröhrchens überschritten wird. Dadurch werden die vom Aceton gelösten Substanzen in den Rundkolben überführt. Gegenüber anderen organischen Verbindungen weist Aceton einen vergleichsweise geringen Siedepunkt auf, weshalb sich die extrahierten Schadstoffe bei jedem weiteren Extraktionszyklus im Kolben anreichern (Seiler et al., 2008). Pro Stunde wurden ca. 6 - 8 solcher Extraktionszyklen durchlaufen. Die Extraktion wurde nach 14 h beendet. Das abgekühlte Extrakt wurde mit einem Rotationsverdampfer (WB 2001; Heidolph, Kehlheim, BRD; 400 mbar, 36-38 ° C) auf etwa 5 ml eingeeengt, anschließend unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 2 ml DMSO rückgelöst. Die Extrakte wurden bis zum Test bei – 20°C gelagert. Als Prozesskontrollen wurden leere Extraktionshülsen einer Extraktion parallel mit ausgewertet. Als Negativkontrolle wurde reines „Kunstwasser“ verwendet. Alle Sedimente wurden von Sabrina Schiwy (RWTH, Aachen) extrahiert.

### **Chemische Analyse der Sedimente**

Die chemische Analytik der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wurde in Kooperation mit Wiebke Meyer und Prof. Christine Achten (Institute of Geology and Palaeontology – Applied Geology, University of Münster) durchgeführt (Tab. 2). Die Ergebnisse zeigen eine sehr starke PAK-Belastung der Sedimentprobe aus dem Veringkanal mit ca. insgesamt 1,6 g/kg Sediment. Die Proben aus dem Rhein sind ähnlich belastet, wobei der PAK-Gehalt im Sediment aus Ehrenbreitein etwas höher ist. Die chemische Analytik der polychlorierten Biphenyle (PCBs) und polychlorierten Dibenzodioxine/-furane (PCDD/PCDFs) wurde in Kooperation mit Maria Larson und Prof. Magnus Engwall (Institutionen för naturvetenskap och teknik, University of Örebro, Sweden) durchgeführt (Tab. 3 und Tab. 4). Die Probe aus dem Veringkanal konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

Tab. 2: Konzentrationen (mg/kg) verschiedener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in den Sedimenten Altrip (Rhein), Ehrenbreitstein (Rhein) und dem Veringkanal (Hamburg). u. BG = unterhalb der Bestimmungsgrenze

	PAK [mg/kg]		
	Altrip	Ehrenbreitstein	Veringkanal
Naphthalin	0,29	0,34	26,84
2- Methylnaphthalin	0,29	0,28	7,89
Acenaphthylen	0,09	0,28	47,37
Acenaphthen	0,05	0,09	41,05
Fluoren	0,04	0,04	56,84
1-Methylfluoren	0,03	0,01	5,68
Phenanthren	0,26	0,27	217,89
Anthracen	0,14	0,34	78,95
9-Methylphenanthren	0,10	0,15	13,26
9-Methylanthracen	0,02	0,01	0,92
Fluoranthren	0,58	0,71	208,42
Pyren	0,66	1,27	138,95
9,10-Dimethylanthracen	<b>u. BG</b>	0,00	0,00
1-Methylpyren	0,12	0,28	56,84
7H-Benzo[c]fluoren	0,05	0,07	6,32
Benzo[ghi]fluoranthren	0,06	0,14	9,47
Benzo[c]phenanthren	0,08	0,14	13,89
Cyclopenta[c,d]pyren	<b>u. BG</b>	<b>u. BG</b>	<b>u. BG</b>
Benz[a]anthracen	0,35	0,54	66,32
Chrysen	0,43	0,42	104,21
6-Methylbenz[a]anthracen	0,02	0,01	11,05
5-Methylchrysen	<b>u. BG</b>	0,00	0,00
Benzo[b+j]fluoranthren	0,69	0,74	138,95
7,12-Dimethyl-Benz[a]anthracen	0,00	0,00	0,00
Benzo[k]fluoranthren	0,19	0,18	31,58
Benzo[e]pyren	0,27	0,27	44,21
Benzo[a]pyren	0,55	0,85	69,47
Perylen	0,00	<b>u. BG</b>	16,11
3-Methylcholanthren	0,00	0,00	0,00
6-Methylbenzo[a]pyren	0,00	0,00	0,00
Indeno-1,2,3-[c,d]pyren	0,29	0,31	47,37
Dibenz[a,h]anthracen	0,10	0,08	5,37
Benzo[g,h,i]perylen	0,29	0,37	44,21
Anthanthren	0,00	0,02	11,68
Dibenzo[a,e]fluoranthren	0,00	0,21	34,74
Dibenzo[a,l]pyren	0,00	0,00	12,32
Dibenzo[a,e]pyren	0,00	0,08	17,05
Dibenzo[a,i]pyren	0,00	0,06	13,89
Dibenzo(a,h)pyren	0,00	0,01	6,95
Σ EPA-PAK (*)	5,00	6,83	1323,79
Σ Gesamt-PAK	6,04	8,57	<b>1606,06</b>

Tab. 3: Konzentrationen (pg/g) verschiedener Dioxine und Furane in den Sedimenten Altrip (Rhein) und Ehrenbreitstein (Rhein).

Name	blank pg/g	Altrip pg/g	Ehrenbreitstein pg/g
2378-TCDF	0,063	2,81	0,410
12378-PeCDF	0,294	3,696	2,758
23478-PeCDF	0,210	5,410	4,304
123478-HxCDF	0,505	0,379	2,646
123678-HxCDF	0,505	0,312	1,155
234678-HxCDF	0,358	3,47	3,75
123789-HxCDF	0,463	1,45	2,12
1234678-HpCDF	1,1147	2,00	12,24
1234789-HpCDF	1,0937	3,228	4,938
OCDF	2,7553	208,337	153,698
<b>Σ-Furane</b>	<b>7,3616</b>	<b>231,0925</b>	<b>188,0182</b>
2378-TCDD	<0.0841	0,356	<0.0745
12378-PeCDD	<0.105	0,868	1,043
123478-HxCDD	0,568	1,046	1,397
123678-HxCDD	0,736	2,071	4,062
123789-HxCDD	1,45	4,898	7,583
1234678-HpCDD	1,220	72,162	91,22
OCDD	4,31	1692,9	1605,1
<b>Σ-Dioxine</b>	<b>8,287</b>	<b>1774,262</b>	<b>1710,367</b>

Tab. 4: Konzentrationen (pg/g) verschiedener polychlorierter Biphenyle in den Sedimenten Altrip (Rhein) und Ehrenbreitstein (Rhein). n.d. = nicht detektierbar

Name	blank pg/g	Altrip pg/g	Ehrenbreitstein pg/g
PCB#28	54,94	1522,5	1235,0
PCB#101	7,01	3249,6	18475,4
PCB#99/113	2,86	784,3	1104,2
PCB#110	0,00	1959,6	8780,3
PCB#118	0,00	1478,0	4216,4
PCB#105	0,00	<174.75	<211.70
PCB#153	8,19	4178,10	21305,64
PCB#141	nd	796,58	5192,24
PCB#138	nd	4083,4	15421,7
PCB#156	nd	267,6	1244,77
PCB#157	nd	1047,8	67,05
PCB#182/187	nd	1733,0	15843,2
PCB#180	nd	2869,8	21887,9
PCB#183	nd	2257,6	20212,8
PCB#170/190	nd	1467,3	8834,2
PCB#189	nd	<111.65	350,82
PCB#194	nd	324,62	3951,25
PCB#206	nd	141,50	349,69
PCB#209	nd	675,32	434,86
<b>Σ-PCBs</b>	<b>72,99</b>	<b>28836,58</b>	<b>148907,42</b>

## Die chemische Analyse im Detail

Für die PAK-Analyse wurde 1 g gefriergetrocknetes Sediment durch Druckflüssigkeitsextraktion (Speed Extractor E-916, Büchi, Essen, Deutschland) nach Zugabe eines internen Standards (16 deuteriertes EPA-PAK in Toluol; Chiron, Tuttlingen, Deutschland) mit Dichlormethan extrahiert. PAK-Analysen wurden gaschromatographisch gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) an einem QP-2010Plus GCMS-System (Shimadzu; Duisburg, Deutschland) durchgeführt, diese war mit einer 60 m Optima 5 MS Accent Kapillarsäule (Macherey-Nagel; Düren, Deutschland) ausgerüstet. Insgesamt wurden 40 verschiedene PAK ( $\Sigma 40$  PAK) -Verbindungen (siehe Tab. 2) einschließlich der 16 EPA PAKs analysiert. Die Quantifizierung wurde durch externe Kalibrierung durchgeführt, wobei die Menge der Zielverbindungen über einen Responsefaktor auf die entsprechenden analytischen Abweichungen korrigiert wurden (Verhältnis von dem Peakbereich der Zielverbindung zu dem Peakbereich des Standards). Die Wiederfindungsrate für die PAKs lag zwischen 80 - 120 % und die Nachweisgrenzen von verschiedenen Verbindungen variierten zwischen 0,001 und 0,01 mg/kg (Hafner et al., 2015).

Die Aceton Soxhlet-Extrakte für die PCB- und Dioxinanalyse wurden erneut in n-Hexan gelöst. Das Extrakt wurde weiter gereinigt wie bei Ericson Jogsten et al. (2010) beschrieben. Nach der Zugabe des internen Standards (markierter Kohlenstoff [ $^{13}\text{C}$ ]) und des Wiederfindungsstandards, wurden die Proben in Glasampullen bei  $-18^\circ\text{C}$  bis zur Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) -Analyse gelagert.

Die PCB-Analyse wurde unter Verwendung eines Gaschromatographen Agilent 7890A (Agilent; Kista, Schweden), gekoppelt an einem Massenspektrometer 5975C, das mit einer 30 m DB-5MS (0,25 mm ID  $\times$  25  $\mu\text{m}$ ) Säule (J & W Scientific-Agilent; Santa Clara, USA) ausgestattet war, durchgeführt. Die Quantifizierung wurde mithilfe einer Isotopenverbindung  $^{13}\text{C}$ -markierten internen Standards durchgeführt (Hafner et al., 2015). Die Konzentrationen von Dioxinen wurden unter der Verwendung eines *Micromass Autospec Ultima* hochauflösendes GC/MS-System (ALS Environmental; Houston, Texas, USA) bestimmt.

Alle Messungen wurden im Modus der selektiven Ionenaufzeichnung durchgeführt, wobei die beiden am häufigsten vorkommenden Ionen des molekularen Chlorclusters überwacht wurden. Die Quantifizierung wurde mithilfe interner Standards durchgeführt. Über eine „*splitless injection*“ wurde 1  $\mu\text{l}$  des Extrakts auf eine 30 m DB-5MS-Säule (J & W Scientific, Folsom, USA) injiziert. Für weitere Details siehe Hafner et al. (2015).

### 2.1.3 Testorganismus -und Fischhälterung

Für die Eierproduktion wurde ein Zuchtbestand von Zebrafischen zwischen 6 und 24 Monaten verwendet. Alle Fische waren frei von äußerlich sichtbaren Krankheitssymptomen und erhielten 6 Monate vor dem Laichen keine pharmazeutische Behandlung. Für die Unterbringung wurden Fische in Glasaquarien gehalten, die ausreichend Platz zum Schwimmen bieten (d. h.  $\geq 1$  L pro Fisch). Trinkwasser mit einer Sauerstoffsättigung von  $\geq 80\%$  wurde verwendet. Konstante Filterung oder permanente Durchflussbedingungen garantierten, dass Ammoniak, Nitrit und Nitrat unter den Nachweisgrenzen gehalten wurden. Die Temperatur

wurde bei  $26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  gehalten, und die Fische wurden unter einem konstanten künstlichen Dunkel-Licht-Zyklus von 14:10 Stunden gehalten. Die Fische wurden zweimal täglich mit kommerziell erhältlichen künstlichen Futtermitteln (z.B. TetraMin TM -Plättchen; Tetra, Melle, Deutschland) gefüttert. Besonders am Tag vor dem Laichen wurde das Futter mit Artemia-Nauplien oder Paramecien geeigneter Größe ergänzt, die aus einer eigener Zucht stammten und nicht kontaminiert waren. Überfütterung wurde strikt vermieden, um eine optimale Wasserqualität zu gewährleisten. Restliche Nahrung und Kot wurden täglich entfernt.

## Eierproduktion

Am Abend vor einem Test wurden Männchen und Weibchen im Verhältnis 2: 1 unmittelbar vor dem „künstlichen Sonnenuntergang“ (Licht aus) in Brutkammern überführt (Braunbeck et al., 2005). Die Brutkammern wurden, mit Ausnahme der Vorderseite, mit schwarzem Silikon beschichtet, um die Sicht zu benachbarten Tanks zu blockieren. Der Boden wurde mit einem rostfreien Stahlgitter mit einer Maschengröße von 1,25 mm bedeckt, um zu verhindern, dass der Laich von den ausgewachsenen Fischen gefressen wird. Als Laichstimulans wurde eine grüne Kunststoffpflanze verwendet. Paarung, Laichen und Befruchtung erfolgten innerhalb von 30 Minuten nachdem am Morgen das Licht wieder angestellt wurde. Eier fielen in rechteckige Glasschalen unter dem Laichbecken. Ca. 30-60 min. nach dem Laichen wurden die Laichschalen entfernt und mit Hilfe eines Binokulars die Befruchtungsrates sowie die Gesamtzahl der Eier bestimmt. Anschließend wurden die befruchteten Eier für die jeweiligen Tests herausgesucht.

### 2.1.4 Der Standard-Fischembryotest (FET)

Der Fischembryotest (FET) wurde gemäß dem von der OECD TG 236 (OECD, 2013) festgelegten Protokoll durchgeführt. Dieser soll kurz erläutert werden: Es wurden jeweils 20 Eier pro Konzentration, die nicht älter als eine Stunde nach der Fertilisation (1 hpf) waren, ausgewählt und sofort in 60 mm Kristallisationsschalen überführt, die jeweils 20 ml der entsprechenden Monosubstanz bzw. Sedimentextrakt in der jeweiligen Konzentration enthielten. Die Testkonzentrationen wurden mit „Kunswasser“ gemäß OECD TG 203 Annex 2 (OECD, 1992) hergestellt. Die genaue Endkonzentration der Elektrolyte betrug: 294,0 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 123,3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 64,7 mg/L  $\text{NaHCO}_3$ ; 5,7 mg/L  $\text{KCl}$ . Der Grad der Gesamthärte lag zwischen 230 und 250 mg/L, der pH-Wert variierte bei  $7,7 \pm 0,1$  und die Temperatur wurde bei  $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$  gehalten. Nach der Kontrolle des Befruchtungserfolgs wurden die Embryonen in 24-Well-Platten überführt, die mindestens 24 Stunden mit der entsprechenden Testsubstanz vorinkubiert (gesättigt) wurden. Die 24-Well-Platten mit den exponierten Embryonen wurden in einem Inkubator bei  $26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  mit einem Lichtregime von 10:14 h gehalten. Als externe und interne Negativkontrolle diente reines Kunswasser und als Positivkontrolle wurde 3,4-Dichloranilin (DCA) in einer Konzentration von 4 mg/L verwendet. Parallel lief zu jedem Test eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO bzw. NaOH) mit. Jede Substanz sowie jede Kontrollgruppe wurden mit jeweils 20 Embryonen in 2 ml Testvolumen pro Well getestet. Die Testprozedur ist semi-statisch, d.h. alle Testlösungen wurden alle 24 h mit frisch zubereiteter Lösung erneuert. Die tägliche Beobachtung von letalen

und subletalen Effekten nach Nagel (2002; Tab. 5) wurde während des Lösungsaustauschs durchgeführt. Die EC<sub>10</sub>-Werte wurden durch Probit-Analyse unter Verwendung von ToxRat<sup>®</sup> Professional 2.10.3.1 (ToxRat Solutions, Alsdorf, Deutschland) bestimmt. Die Embryotests wurden als valide eingestuft, wenn die Mortalität in der Negativkontrolle ≤ 10 % und die Positivkontrolle (DCA) Mortalitäten zwischen 20 und 80 % zeigten (Lammer et al., 2009).

Tab. 5: Letale und subletale Effekte im Fischembryotest des Zebrafisch (Danio rerio) nach Bachmann (2002), Nagel (2002) und OECD TG 236 (OECD, 2013).

Toxikologischen Endpunkte	Expositionszeit [h]			
	24	48	96	120
Koagulation	+	+	+	+
Somiten nicht ausgebildet	+			
Schwanz nicht abgelöst	+			
Fehlender Herzschlag		+	+	+
Fehlender Schlupf			+	+
Keine spontanen Bewegungen	•			
Reduzierter Herzschlag		•	•	•
Fehlende Blutzirkulation		•	•	•
Reduzierte Blutzirkulation		•	•	•
Beeinträchtigte Augenentwicklung	•	•	•	•
Allgemeine Unterentwicklung	•	•	•	•
Ödeme		•	•	•
Veränderte Augenpigmentierung		•	•	•
Allgemeine Missbildungen	•	•	•	•
Schwanzfehlbildung		•	•	•
Wirbelsäulenfehlbildung			•	•

+: letaler Endpunkt; •: subletaler Endpunkt

### 2.1.5 Statistik

Für diese Arbeit wurde eine statistische Analyse der Embryotoxizität mit ToxRat<sup>®</sup> (ver. 2.10.03; ToxRat Solutions, Alsdorf, Deutschland) durchgeführt, wobei ein zweiparametrisches logistisches Regressionsmodell zur Berechnung der EC<sub>50</sub>- und EC<sub>10</sub>-Werte verwendet wurde. Ein umfassendes Diagramm aller drei Replikate pro Chemikalie wurde dann mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2009) mit einem zwei- oder dreiparametrischen Regressionsmodell erstellt. Die Reproduzierbarkeit der unabhängigen Replikate wurde über den Variationskoeffizienten (CV) - die Standardabweichung gegenüber dem Mittelwert in Prozent - bewertet und als gültig eingestuft, wenn der CV ≤ 30% war.

## 2.2 Live-Imaging-EROD-Assay

Der Text des folgenden Abschnitts 2.2 stammt aus der Standard Operating Procedure (SOP; 2011): „*In vivo EROD-Assay - Nachweis von dioxinähnlicher Wirkung in (komplexen) Umweltproben*“, ausgearbeitet für die Arbeitsgruppe: Aquatische Ökologie und Toxikologie, 8 S. und wurde im Original von mir geschrieben:

### 2.2.1 Exposition der 24-Well-Platten

Material:

- Latex-Einmalhandschuhe
- Glasgeräte zum Ansetzen der Konzentrationsstufen:
  - 8 Erlenmeyerkolben (30 ml),
  - 8 Rührfische, entsprechende Pipetten mit Spitzen
- Fünf 24er-Wellplatten, Edding zum Beschriften der Platten
- Eine Abdeckung (z.B. ein Karton, Alufolie etc.) für die Wellplatten
- Konfokalgläschen (glass bottom culture dishes™, MatTek Cooperation)
- 20 ml-Becherglas mit kleinem Rührfisch
- Pipette um die Larven zu transportieren
- Abgeschnittene Pipettenspitzen (200 µL, gelbe)
- Aufkleber für die Deckel der Konfokalgläschen
- Federstahlpinzette

Geräte:

- pH-Messgerät
- Inkubationsschrank auf 27°C mit Lichtsteuerung über Zeitschaltuhr gesteuert
- Stoppuhr
- Magnetrührer mit Heizplatte
- Nikon ECLIPSE 90i Epifluorescence Mikroskop (Nikon Instruments; Tokyo, Japan)

Reagenzien:

- Kunstwasser (s. 1.02.1.4 im Detail)
- Jeweils 20 ml aus den einzelnen Stammlösungen auf 2 L destilliertes Wasser:
  - o Calciumchlorid (Calciumchlorid 2 H<sub>2</sub>O): 14.7 g in 500 ml *destilliertem H<sub>2</sub>O*
  - o Magnesiumsulphatheptahydrate (Magnesiumsulfat 7 H<sub>2</sub>O): 6.165 g in 500 ml *destilliertem H<sub>2</sub>O*
  - o Natriumbicarbonat (Natriumhydrogencarbonat): 3.15 g in 500 ml *destilliertem H<sub>2</sub>O*
  - o Kaliumchlorid: 0.275 g in 500 ml *destilliertem H<sub>2</sub>O*
- Das Kunstwasser wird vor Versuchsbeginn bei 27 °C temperiert und bis zur Sauerstoffsättigung belüftet (ca. 15 - 30 min.). Der pH-Wert wird mit 0,1 M HCl auf 7,5 - 7,8 eingestellt.
- β-Naphthoflavon-Stammlösung [0,1 g/L] in DMSO (Konzentration der Positivkontrolle 10 µg/L)
- Dimethylsulfoxid für die Lösungsmittelkontrolle, getestet wird die höchste LSM-Konzentration die im Versuch verwendet wurde
- 7-Ethoxyresorufin-Stammlösung [200 mg/L] in DMSO (Konzentration der Inkubationslösung 1,2 mg/L)
- Tricain-Lösung 0,016 % [0,04 g/250 ml]
- Tricain-Agarose (0,1 g Agarose auf 10 ml Tricain-Lösung 0,016 %)
- Ethanol 96 %

### Durchführung: Exposition der 24-Well-Platten

Angesetzt werden drei Konzentrationsstufen mit einem Endvolumen von 30 ml. Die Konzentrationen ergeben sich aus dem vorhergegangenen Fischembryotest. Es sollten die  $EC_{10}$ -Konzentrationen und jeweils eine über und unter dem entsprechenden  $EC_{10}$ -Wert gewählt werden. Die Belegung der Wellplatten folgt wie auf dem Schema in Abb. 10 gezeigt wird. In jedes Well kommen 2 ml der entsprechenden Lösungen. Die äußeren vier Wells stellen jeweils die internen Negativkontrollen mit reinem Kunstwasser dar.

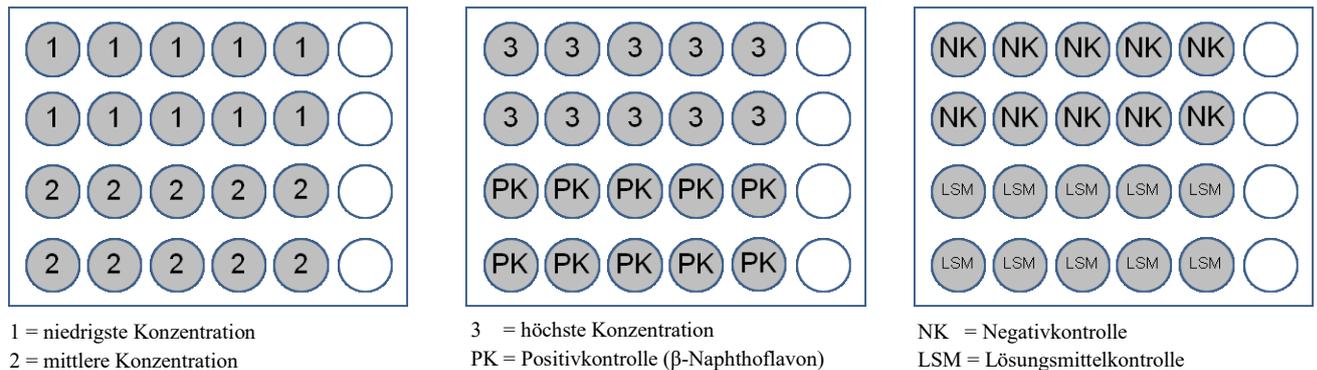


Abb. 10: Pipettierschema für die Exposition der Larven mit den entsprechenden Monosubstanzen bzw. Sedimentextrakten, der Positiv- Negativ- und der Lösungsmittelkontrolle.

### 2.2.2 Exposition beim Kombinationsversuch

Bei dem Kombinationsversuch werden die gleichen Konzentrationen wie oben beschrieben angesetzt, jedoch wird in jede Lösung  $10 \mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavon zusätzlich pipettiert, sodass eine CYP1A-Induktion garantiert ist (Abb. 11). Bei der 3 h-Exposition wird in jedes Well eine 72 h alte Larve überführt und über 3 h exponiert.

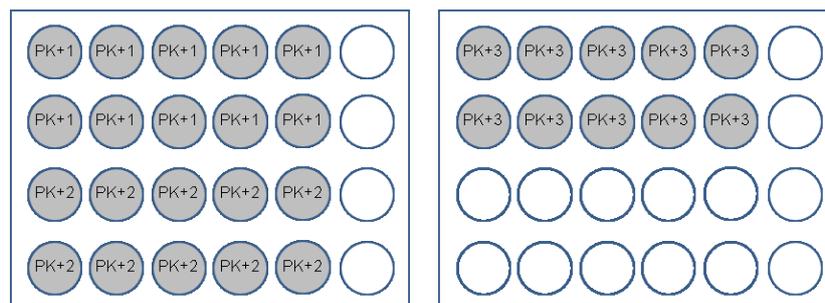


Abb. 11: Pipettierschema für den Kombinationsversuch. Zu jeder Lösung der drei Konzentrationen wird  $10 \mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavon pipettiert.

### 2.2.3 Vorbereitung der Wellplatten für die 7-Ethoxyresorufin-Inkubation

Vor der Belegung der Wellplatten wird die 7-Ethoxyresorufin-Lösung [ $1,2 \text{ mg/L}$ ] in einem abgedunkelten Erlenmeyerkolben angesetzt und bis zum Pipettieren gerührt. Es werden  $120 \mu\text{l}$  aus der 7-Ethoxyresorufin-Stammlösung [ $200 \text{ mg/L}$ ] auf 20 ml Kunstwasser pipettiert. Die Belegung der Wellplatten erfolgt wie auf dem Schema in Abb. 12 dargestellt. Die oberen zwei Reihen (blau) werden jeweils mit 2 ml Wasser befüllt. In die dritte Reihe (rot) kommt jeweils 1 ml 7-Ethoxyresorufin-Lösung (wird aber erst ganz zum Schluss dazu pipettiert, damit die

Lichtexposition relativ geringgehalten wird) und in die letzte Reihe (dunkelblau) 1 ml Tricain-Lösung 0,016 %.

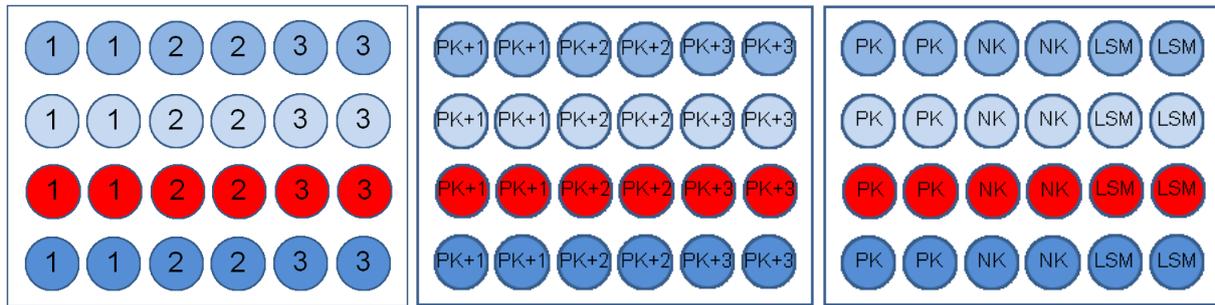


Abb. 12: Pipettierschema für das Waschen und Inkubieren mit 7-Ethoxyresorufin der einzelnen Konzentrationen, des Kombinationsversuches und der Kontrollen.

Die Larven werden aus der Exposition ins Wasser überführt, dabei werden immer zwei Larven in einem Well zusammen gewaschen, sodass man letztendlich immer 4 Larven pro Konzentration hat. Nach 5 min werden sie in Reihe 2 überführt und ein weiteres Mal gewaschen. In der Zwischenzeit wird jetzt das 7-Ethoxyresorufin in die Reihe 3 pipettiert und anschließend werden die Larven in die 7-Ethoxyresorufin-Lösung überführt. Ab dem Zeitpunkt der Inkubation müssen die Platten vor Licht geschützt werden (z.B. mit einem Karton). Mithilfe einer Stoppuhr werden die Larven genau 20 min mit 7-Ethoxyresorufin inkubiert. Nach den 20 min werden die Larven in Tricain überführt. Um sicher zu gehen, dass alle Larven eine relativ gleiche Inkubationszeit von 20 min haben, sollte die Reihenfolge bei der Überführung in Tricain die gleiche sein wie bei der Inkubation.

#### 2.2.4 Präparation der Larven

Während die Larven in 7-Ethoxyresorufin inkubieren, kann die Agarose für die Fixierung angesetzt werden. 0,1 g Agarose mit 10 ml 0,016 % Tricainlösung wird bei 300 °C aufgeköcht, sobald die Agarose flüssig ist, wird das Becherglas in ein Wasserbad überführt und die Temperatur wird auf  $26 \pm 3$  °C gebracht und möglichst gehalten. Die Agarose wird permanent gerührt und flüssig gehalten, die Temperatur des Wasserbades wird mit einem Thermometer überprüft. Damit die Agarose nicht fest wird, befindet sich der Magnetrührer genau neben dem Binokular, an dem anschließend präpariert werden soll. Die Larven werden mit einem Tropfen Wasser auf das Konfokalgläschen (Abb. 13; Beschriftungsaufkleber nicht vergessen) überführt und das überschüssige Wasser wird abgezogen. Es befinden sich jeweils immer zwei Larven in einem Konfokalgläschen. Die Larven werden mit einem Tropfen flüssiger warmer Agarose fixiert. Damit die Pipettenspitze nicht sofort verstopft, sollten die Spitzen der Pipettenspitzen vorher abgeschnitten werden. Sobald die Larve sich in der Agarose befindet, muss sie schnellstmöglich in die richtige Position (linke Seitenlage) gebracht werden. Je fester die Agarose mit der Zeit wird, desto stärker wird das Verletzungsrisiko für den Fisch. Die Larve darf nur mit einer Federstahlpinzette berührt werden, wobei man eine direkte



Abb. 13: Konfokalgläschen

Berührung vermeiden sollte. Am besten dreht man das Tier indirekt mit der Agarose, so dass keine Mikrotraumata gesetzt werden können. Liegt die Larve richtig, werden die abgedeckten Konfokalgläschen bis zu der EROD-Messung im Dunkeln aufbewahrt. Während der Präparation sollten die Wellplatten sich immer im Dunkeln befinden, um eine Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden!

Alle Konfokalgläschen werden temperatur- und lichtgeschützt in einer Styroporbox zum Konfokalmikroskop (Nikon C1) transportiert (Gebäude INF 504). Bevor mit der Auswertung am Mikroskop begonnen wird, müssen jeweils 2 ml Kunstwasser auf die Agarose, um diese vor dem Austrocknen zu schützen (nicht direkt auf die Agarose).

### **2.2.5 Mikroskopische Auswertung am Nikon ECLIPSE 90i:**

Die Auswertung erfolgt an dem Epi- und Konfokalfluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE 90i (Nikon, Tokio, Japan) mit der Software NIS Elements Version 4.0 imaging software (Nikon Instruments) und sollte nur durch eine direkte Einweisung an dem Mikroskop durchgeführt werden. Untersucht werden die Embryonen mit einem 10× Nikon Plan Flour Wasserimmersionsobjektiv (NA 0.3, WD 16.0 m) mit einem Excitationsspektrum von  $560 \pm 40$  nm, einem Emissionsspektrum von  $630 \pm 60$  nm und einem dichromatischen Strahlenteiler von 595 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff Resorufin wird mit einer Wellenlänge von 562 nm (grün) durch eine Lochblende (Pinhole-Radius:  $2,4 \mu\text{m}$ ) angeregt und emittiert bei 610 nm (orange). Verwendet wird ein Texas Red HYQ-Filter und die Bilder werden mit der Kamera (DS-Ri-1, Nikon, Japan) aufgenommen. Für die Konfokalbilder werden Z-Steps zwischen 25 und 30 ausgewählt. Es empfiehlt sich von seinen Mikroskop- und Kameraeinstellungen Screenshots durchzuführen, damit man bei der darauffolgenden Messung die gleichen Einstellungen wiederverwenden kann.

### **Belichtungszeiten**

Am Anfang muss die optimale Belichtungszeit für alle Proben gefunden werden. Man beginnt am besten mit der Positivkontrolle, die das stärkste Signal haben sollte. Hier probiert man die längst mögliche Belichtungszeit zu finden, sodass man sich gerade noch unter der Überbelichtung befindet. Danach wird die Negativ- und die Lösungsmittelkontrolle mit den gleichen Mikroskop- und Kameraeinstellungen abgelichtet und verglichen. Ist das Bild der Negativkontrolle zu dunkel, dann muss die Belichtungszeit der Positivkontrolle evtl. nachkorrigiert werden. Hat man die optimale Belichtungszeit gefunden, wird diese für ALLE weiteren Aufnahmen verwendet. Nur indem man die identischen Kamera- und Mikroskopeinstellungen verwendet, ist eine Vergleichbarkeit der Bilder garantiert! Bei der Epifluoreszenz ist es ebenfalls wichtig, dass man immer probiert, die gleiche Fokusebene einzustellen (z.B. eine Rundung am Dottersack), sodass auch hier eine gute Vergleichbarkeit der Signalintensitäten hergestellt wird. Die Epifluoreszenzbilder sollten immer vor den Konfokalaufnahmen stattfinden, da der Fluoreszenzfarbstoff durch den Laser stark ausgebleicht wird, sodass die Signalstärke der Probe verfälscht werden würde.

## 2.2.6 Quantitative Auswertung

Mithilfe des ROI-(Region Of Interest) Managers, einer Werkzeugfunktion der NIS Elements Imaging Software 4.0, kann man ausgewählte Regionen des Bildes analysieren, die Graustufenintensitäten messen und miteinander vergleichen. Die gemessenen Werte können in eine Excel-Datei exportiert werden und dementsprechend ausgewertet werden. Eine quantitative Aussage kann nur mit den Epifluoreszenzbildern gemacht werden. Anhand der Konfokalaufnahmen kann man sehr gut organspezifische Induktionsmuster erkennen, eine quantitative Aussage ist jedoch nicht möglich.

**Nach der EROD-Auswertung** werden die Larven aus den Konfokalgläschen abpipettiert und in Ethanol 96 % abgetötet. Die Wasch- und Inkubationsplatte werden nur ausgewaschen und für die nächste Auswertung am Folgetag wiederverwendet.

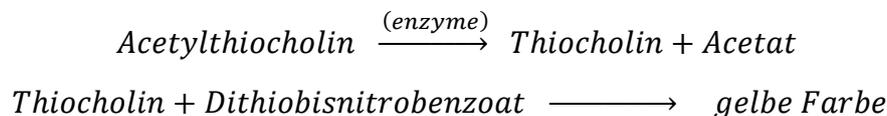
Insgesamt wird die Auswertung des EROD-Signals anhand von 72, 96 und 120 h alten Larven, wie in Abschnitt 2.2.1 bis 2.2.61.02.2.6 beschrieben, wiederholt.

## 2.3 AChE-Assay

Der Text des folgenden Abschnitts 2.3 stammt aus der Standard Operating Procedure (SOP; 2011): „*AChE-assay - Nachweis der Acetylcholinesterasehemmung als neurotoxischer Endpunkt*“, ausgearbeitet für die Arbeitsgruppe: Aquatische Ökologie und Toxikologie, 8 S. und wurde in Zusammenarbeit mit Stengel, D. im Original zu gleichen Anteilen gemeinsam geschrieben:

### 2.3.1 Testprinzip: Ellmans-Esterase Assay

Das Testprinzip des Acetylcholinesterase-Assay nach Ellman et al. (1961) ist eine photometrische Methode zur Ermittlung der Acetylcholinesterase-Aktivität. Durchgeführt wird der Assay mit Gewebehomogenaten aus 5 gepoolten Zebraquarienfischembryonen. Die Acetylcholinesterase vermittelt die Umwandlung des Neurotransmitters Acetylcholin (AChE) in Cholin und Acetat und damit dessen Inaktivierung. Das Grundprinzip der Enzymaktivitätsmessung besteht in einer Zunahme des gelben Farbstoffes aus der Reaktion von Thiocholin mit dem Substrat Dithiobisnitrobenzoat (DTNB).



Genauer gesagt, wird die Rate ermittelt, mit der die Acetylcholinesterase das Substrat Acetylthiocholinjodid zu Thiocholinjodid und Acetat umsetzt. Die Messung erfolgt allerdings indirekt, anhand der kontinuierlichen Reaktion des Thiols mit dem 5,5'-Dithiobis-nitrobenzoat Ion (I). Diese Umsetzung führt zur Bildung des gelben 5-Thio-2-nitro-benzoesäure Anions (II), (Abb. 14).

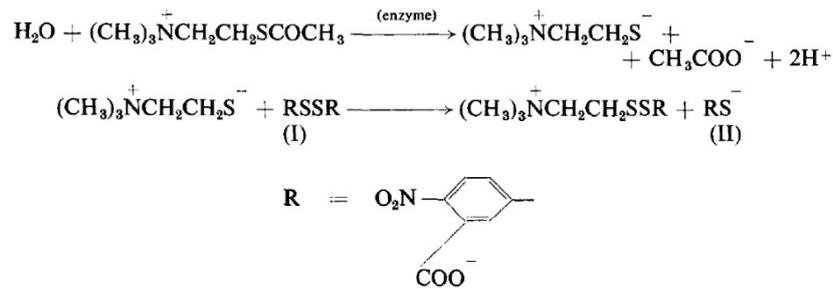


Abb. 14: Umsetzung des Farbstoffes, 5,5'-Dithiobis-nitrobenzoat Ion (I) (DTNB) zu dem gelben 5-Thio-2-nitro-benzoessäure Anion (II).

Extinktionskoeffizient  $\epsilon=13.600 \text{ l}/(\text{mol}\times\text{cm})$

Die Umsatzrate oder Bildung des 5-thio-2-nitro-benzoessäure Anions (II) wird durch die Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 412 nm im Photometer/Reader kinetisch dargestellt. Die Substratumsetzung erfolgt in rascher Abfolge und liefert Ergebnisse innerhalb weniger Minuten.

Als Ergebnis wird hierbei die Extinktionsveränderung (Reaktionsgeschwindigkeit) als Veränderung der optischen Dichte pro Minute erhalten:

$$\Delta E = \text{OD}/\text{min}$$

Mit Hilfe des *Lambert-Beer'schen Gesetzes*:

$$\Delta E = \epsilon \times d \times \Delta C$$

lässt sich die umgesetzte Substratmenge:

$$\Delta C \text{ in mol}/(\text{L}\times\text{min})$$

ermitteln. Anhand der umgesetzten Substratmenge, ergibt sich die Enzymaktivität:

$$\mu\text{mol}/\text{min} = U \text{ (Units)}$$

Die spezifische Enzymaktivität wird ermittelt als umgesetztes Substrat in  $\mu\text{mol}$  pro Minute = U bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Probe:

$$U/\text{mg}$$

Umrechnungen nach Ellman et al. (1961). In den folgenden Arbeitsschritten wurde die Methode nach Küster (2005) modifiziert.

### 2.3.2 Exposition der Embryonen für den Acetylcholinesterase-Assay

Die Exposition der Embryonen erfolgte gemäß dem von der OECD TG 236 (OECD, 2013) festgelegten Protokoll des standardisierten FETs in 24 h vorbelasteten 24-Well-Platten bis 96 hpf mit jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen. Beginnend mit der EC<sub>10</sub> Konzentration als höchste und dann jeweils um den Faktor 0,5 niedriger. Der Test wurde semi-statisch durchgeführt. Paraoxon dient als Positivkontrolle in einer Konzentration von 2 mg/L. Insgesamt wurden drei Replikate mit jeweils fünf Embryonen durchgeführt.

Die Sedimentextrakte wurden, wie in 1.02.1.2 beschrieben, hergestellt.

## Dotierung der Sedimentextrakte

Um potenzielle Maskierungseffekte von Acetylcholinesterase-hemmenden Sedimentkomponenten zu erkennen, wurden exemplarisch die Sedimentextrakte vom Veringkanal mit Chlorpyrifos jeweils in der EC<sub>10</sub>-Konzentration in einem Kombinationsversuch getestet.

## Durchführung: AChE-Assay

### Reagenzien:

- Acetylthiocholinjodid [0,9 mM] (CAS: 1866-15-5), Substrat für die Enzymkinetik
  - o (2,7 mM Stock: 7,8 mg in 10 ml Phosphatpuffer)
- Rinderserumalbumin (BSA; CAS: 9048-46-8)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Ellman's Reagenz; CAS: 69-78-3)
- Paraoxonmethyl (PO; CAS: 950-35-6), Positivkontrolle für Acetylcholinesterasehemmung
- DC-Protein Assay Kit (BioRad, München, Deutschland) für die Proteinbestimmung basierend auf Lowry (1951)
- Triton X 100 (CAS: 9002 93 1; Merck, Darmstadt, Deutschland)

### Testsubstanzen

Tab. 6: Testsubstanzen für den AChE-Assay im Überblick. Alle Stammlösungen und Testkonzentrationen wurden gemäß OECD TG 236 (OECD, 2013) mit „Kunstwasser“ (1.02.1.4) hergestellt.

Monosubstanz	CAS- Nummer	Stammlösung [mg/L]	Testkonzentration [mg/L]	Lösungsmittel
3,4-Dichloranilin	95-75-1	10	4	
Methylquecksilberchlorid	115-08-3	10	0,03	
Chlorpyrifos	2921-88-2	600	0,2; 0,4 und 0,6	DMSO [0,1%]
Aroclor 1254	11097-69-1	25.000	3	DMSO [0,2 %]
2,3-Benzofuran	271 89 6	500	11	
Chinolin	91-22-5	500	9	
Bisphenol A		500	4	NaOH/H <sub>2</sub> O
Paraoxonmethyl	950-35-6		1; 2 (PK-Konz.); 4	
<b>Sedimentextrakte</b>		<b>SEQ g/ml</b>	<b>SEQ mg/ml</b>	
Altrip		20	5	DMSO [0,25]
Ehrenbreitstein		20	5	DMSO [0,25]
Veringkanal		20	0,018	DMSO [0,25]

### 2.3.3 Probenvorbereitung für die Messung

Am Ende der jeweiligen Exposition wurden die Embryonen in neuen Wellplatten 3 x 10 min. mit „Kunstwasser“ gewaschen. Jeweils fünf Embryonen einer Konzentration wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß überführt, der wässrige Überstand wurde abgezogen und die Embryonen wurden mit flüssigen Stickstoff schockgefroren. Lagerung bei -20°C. Alle Konzentrationen einer Versuchsreihe (3 Konzentrationen + Positiv- und Negativkontrolle) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,4 ml eiskaltem Phosphat-Puffer im TissueLyzer® (Tissuelizer II, Qiagen, Hilden) bei 30 Hz für eine Minute homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 10.000 x g in einem neuen Eppendorfgefäß für 15 min. bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Enzymkinetik und Proteinbestimmung auf einem GENios® Platereader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) wie bei Küster (2005) ausgewertet. Alle Enzymmessungen wurden pro Konzentration viermal gemessen mit jeweils 5 gepoolten Embryonen. Die Enzymaktivität wurde als Änderung der optischen Dichte ( $\Delta OD/min/x$  mg Protein) nach Ellman et al. (1961) angegeben.

### 2.3.4 Statistik

Die statistische Analyse für die Enzymkinetik wurde mit dem Programm: Sigma-Plot 12.3 (Systat Software Inc., Erkrath, Deutschland) unter Verwendung von One-Way-ANOVA und Dunns Test durchgeführt.

## ERGEBNISSE

### 3.1 Fischembryo-Test - EC<sub>10</sub>-Bestimmung

Der Text der folgenden Abschnitte 2.03.1.1 und 2.03.1.3 -2.03.1.6 basiert auf den Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (Danio rerio)*“, 318 S und wurde in Zusammenarbeit mit Keiter et al. (2013) geschrieben.

Der Text des Abschnitts 2.03.1.2 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*“ Sci Total Environ; 615: 330-347 alle Texte wurden im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Grundsätzlich waren alle durchgeführten Tests (n=2-3) gemäß den OECD TG 236-Validitätskriterien gültig (OECD, 2013): Sowohl die internen als auch die externen Negativkontrollen zeigten eine Überlebensrate von  $\geq 90\%$  und alle Positivkontrollen zeigten Mortalitäten  $\geq 30\%$  nach 96 h Exposition. Die mittlere Mortalität der Lösungsmittelkontrolle (0,25% DMSO) betrug 3,1 % für alle Tests (n = 25).

#### 3.1.1 Methylquecksilberchlorid

Insgesamt wurden zur Ermittlung der allgemeinen Embryotoxizität acht Fischembryotoxizitätstests (FET) mit Methylquecksilberchlorid durchgeführt. Aufgrund der hohen Toxizität, musste mit sehr niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden. Niedrige Konzentrationen sind experimentell generell schwierig einzustellen, sodass kleine Abänderungen im Testsystem zu relativ großen Schwankungen in den Ergebnissen führen können. Vor allem musste geprüft werden, inwiefern sich die Vorbelastung der Mikrotiterplatten auf die Konzentration des Testmediums auswirken und sich evtl. in unterschiedlichen LC/EC-Werten manifestieren. Während der Vergleich der LC-Werte aus dem Test mit und ohne Vorbelastung der Wellplatten kaum Unterschiede in den LC-Werten zeigte, wurden hingegen deutliche Unterschiede in den EC-Werten beobachtet. Die Effekte in den vorbelasteten Wellplatten traten deutlich früher auf.

Des Weiteren unterscheidet man statische und semistatische Testsysteme. Bei einem statischen Testsystem werden die Lösungen nicht ausgetauscht, bei einem semistatischen hingegen werden die Testlösungen alle 24 Stunden erneuert. Hier wurden nun die statischen mit den semi-statischen Testsystemen verglichen, und es wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Während bei den statischen Testsystemen nur bei höheren Konzentrationen Effekte zu erkennen waren, konnten bei dem semi-statischen Testsystemen ebenfalls in den niedrigeren Konzentrationen Effekte beobachtet werden. Das semi-statische Testsystem garantiert stabilere Konzentrationen vor allem bei den niedrigeren Konzentrationen und ermöglicht deren Effekte vertrauenswürdiger darzustellen. Da Quecksilber relativ schnell stabile Komplexe mit Carbonaten, chlor- oder schwefelhaltigen (vor allem organischen Liganden) bilden kann, kommt es offensichtlich bei niedrigen Konzentrationen über Komplexierungsreaktionen schnell zu einem Abfall der tatsächlichen Expositionskonzentration. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden fortan alle Testsysteme semistatisch und mit vorbelasteten Wellplatten durchgeführt. Der gemittelte EC<sub>10</sub> für Methylquecksilberchlorid lag nach einer 96 h-Exposition

bei  $31,89 \pm 5,21 \mu\text{g/L}$  und der Variationskoeffizient bei 16,35 %. Der  $\text{EC}_{50}$  lag bei  $36,87 \mu\text{g/L} \pm 3,35 \mu\text{g/L}$  und der Variationskoeffizient bei 9,08 % ( $n=2$ ).

Die prominentesten Effekte nach einer Methylquecksilber-Exposition traten in Form einer Verkrümmung der Schwanzspitze (Abb. 15) sowie im Auftreten von Perikardialödemen und unkoordinierten Schwimmbewegungen auf, die letztendlich in einer Art Lähmung endeten. Die verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit sowie die beobachteten Lähmungserscheinungen bestätigen den Verdacht einer neurotoxischen Wirkung.



Abb. 15: Embryo eines Zebrafährblings nach einer 120 h- Exposition gegenüber  $70 \mu\text{g/L}$  Methylquecksilberchlorid. Die Schwanzspitze zeigt eine deutliche Verkrümmung (A) und Detailaufnahme (B) auf. Zudem ist ein Perikardialödem (\*) und eine leichte Kieferdeformation (→) zu erkennen.

### 3.1.2 Chlorpyrifos

Der gemittelte  $\text{EC}_{10}$  für Chlorpyrifos lag nach einer 96 h-Exposition bei  $0,62 \pm 0,13 \text{ mg/L}$  ( $n=3$ ) mit einem Variationskoeffizienten bei 21,72 %. Der gemittelte  $\text{EC}_{50}$  lag bei  $1,11 \pm 0,15 \text{ mg/L}$  mit einem Variationskoeffizienten bei 13,84 %. Mit längerer Expositionszeit nahm die Toxizität deutlich zu. Nach 120 h Exposition lag der gemittelte  $\text{EC}_{10}$  bei  $0,38 \pm 0,01 \text{ mg/L}$  mit einem Variationskoeffizienten bei 3,36 % und der gemittelte  $\text{EC}_{50}$  lag bei  $0,66 \text{ mg/L} \pm 0,03 \text{ mg/L}$  mit einem Variationskoeffizienten bei 4,46 %. Bei den Negativ- und Lösungsmittelkontrollen betrug die Mortalitätsraten jeweils 0 % (Abb. 16 A, B).

Die kombinierte Exposition mit Chlorpyrifos und  $10 \mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavin führte nach 120 h zu einer Zunahme der Toxizität von ca. 40 % gegenüber der Monosubstanz Chlorpyrifos (Abb. 16 C). Der gemittelte  $\text{EC}_{10}$  für den Kombinationsversuch lag nach 120 h bei  $0,23 \pm 0,01 \text{ mg/L}$

(n=3) mit einem Variationskoeffizienten bei 3,21 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei 0,35 ± 0,04 mg/L mit einem Variationskoeffizienten von 12,53 %.

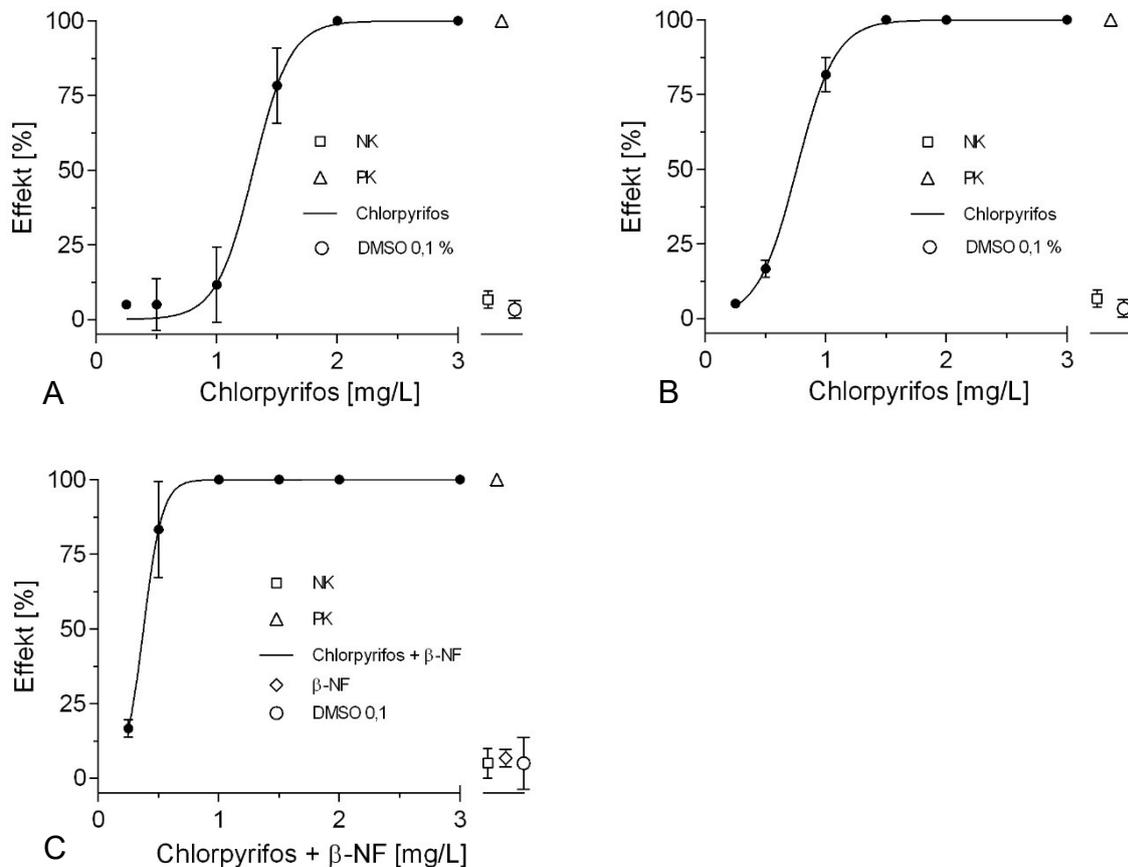


Abb. 16: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebrafärblings (*Danio rerio*) nach 96 h (A) und 120 h (B, C) Exposition gegenüber Chlorpyrifos als Einzelverbindung (A, B) sowie in Kombination mit 10 µg/L β-Naphthoflavin (β-NF) nach 120h (C). Die Negativ- (NK), Lösungsmittel (0,1 % DMSO) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Der steilere Kurvenanstieg nach 120 h weist auf eine gesteigerte Toxizität nach längerer Exposition hin (B). Die kombinierte Exposition von Chlorpyrifos und β-Naphthoflavin (C) zeigt allerdings den steilsten Kurvenverlauf und bildet die höchste Toxizität ab. Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Als häufigster subletaler Effekt nach 96 h wurden Ödeme beobachtet. Es traten hauptsächlich Perikardial- und Dottersacködeme auf. Das Dottersacködem bildete sich zwischen dem Dotter und den Myotomen (Muskelsegmenten), wobei sich der Dotter von den Myotomen abtrennte (Abb. 17 B). Mit Zunahme der Belastungsdauer vergrößerten sich die Ödeme. Der Dotter selbst war zum großen Teil zu zahlreichen runden Partikeln verklumpt (Abb. 17 B). Vereinzelt war der Dotterfortsatz vollständig vom restlichen Dotter abgelöst (Abb. 17 B). Mit zunehmender Konzentration nahm sowohl die Anzahl der Embryonen mit Ödemen als auch die Größe der Ödeme zu. Bei der höchsten Konzentration von 3 mg/L bildeten sich im Verlauf der Embryonalentwicklung bei allen Embryonen Dottersacködeme aus.

Als weiterer Effekt wurde eine Wirbelsäulendeformation beobachtet. Die Deformation war durch eine konvexe Krümmung der Wirbelsäule zu erkennen (Abb. 17 A). Bei 70 % der insgesamt 60 Embryonen wurde bei einer Konzentration von 3 mg/L eine solche charakteristische Wirbelsäulenverkrümmung festgestellt. Der Grad der Verkrümmung war konzentrations- und zeitabhängig. Zusätzlich konnten vereinzelt geknickte Schwanzspitzen

beobachtet werden (Abb. 17 A). Die spezifische Wirbelsäulenverkrümmung und die gebogenen Schwanzflossen führten zu Verhaltensdefiziten wie die Beeinträchtigung der Schwimmaktivität. Neben den morphologischen Veränderungen waren auch neurologische Effekte erkennbar: Mit zunehmender Konzentration wurde ein schnelles unkoordiniertes Zucken der Embryonen beobachtet, das bis hin zur Lähmung führen konnten.

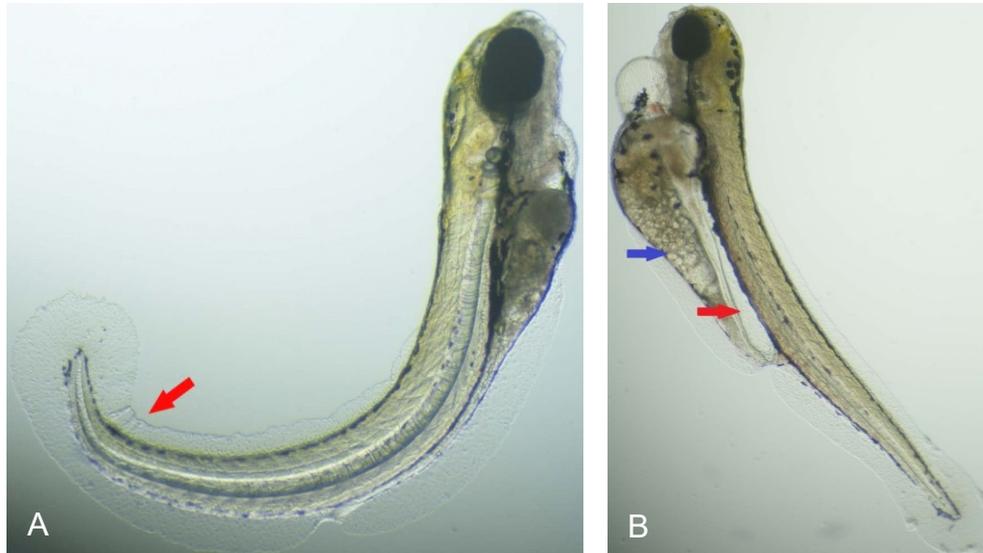


Abb. 17: 144 h alte Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach einer 144 h-Exposition gegenüber 1 mg/L (A) und 2 mg/L (B) Chlorpyrifos. Der Embryo (A) zeigt eine charakteristische Wirbelsäulenverkrümmung mit einer abgeknickten Schwanzspitze (**roter Pfeil, A**). Der höher exponierte Embryo (B) zeigt ein fortgeschrittenes Dottersacködem (**roter Pfeil, B**) sowie ein stärkeres Perikardialödem (\*). Der Dotter enthält runde Dotterpartikel (**blauer Pfeil**). Zusätzlich ist ebenfalls eine leichte Wirbelsäulenverkrümmung erkennbar. Abb. von Anika Helleis

Die gesteigerte Toxizität des Kombinationsversuches wurde insbesondere durch die Zunahme der Ödeme und der Kiefermissbildungen deutlich (Abb. 18 B).

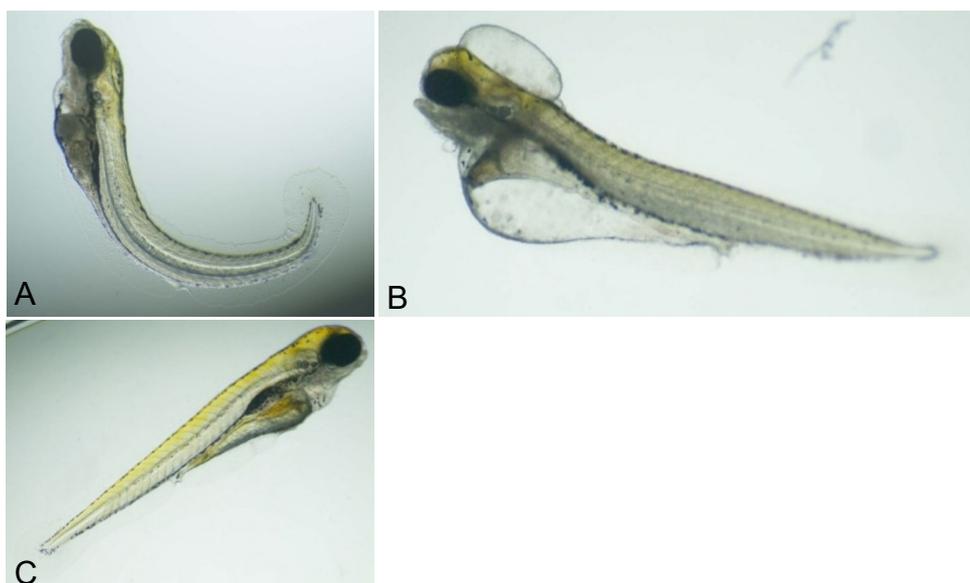


Abb. 18: 144 h alte Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach einer 144 h-Exposition gegenüber 1 mg/L Chlorpyrifos als Monosubstanz (A), im Kombinationsversuch mit 10 µg/L β-Naphthoflavon (B) und der Negativkontrolle (C). Der Embryo zeigt nach der Einzelverbindungs-Exposition die charakteristische spinale Deformation (konvexe Krümmung) und einen gebogenen Schwanz (A). Der Embryo nach dem Kombinationsversuch zeigt ausgeprägte Ödeme im Perikard, Dottersack und Kopfbereich sowie Kiefermissbildungen (B). Abb. von Anika Helleis.

### 3.1.3 Bisphenol A

Der gemittelte EC<sub>10</sub> für Bisphenol A lag nach einer 96 h-Exposition bei  $3,84 \pm 0,58$  mg/L (n=4) und der Variationskoeffizient bei 15,18 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag nach einer 96 h-Exposition bei  $5,91 \pm 0,66$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 11,11 %. Mit längerer Expositionszeit nahm die Toxizität kaum zu. Nach einer 120 h-Exposition lag der gemittelte EC<sub>10</sub> bei  $3,64 \pm 0,21$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 5,82 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei  $5,1 \pm 0,82$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 16,04 % (Abb. 19).

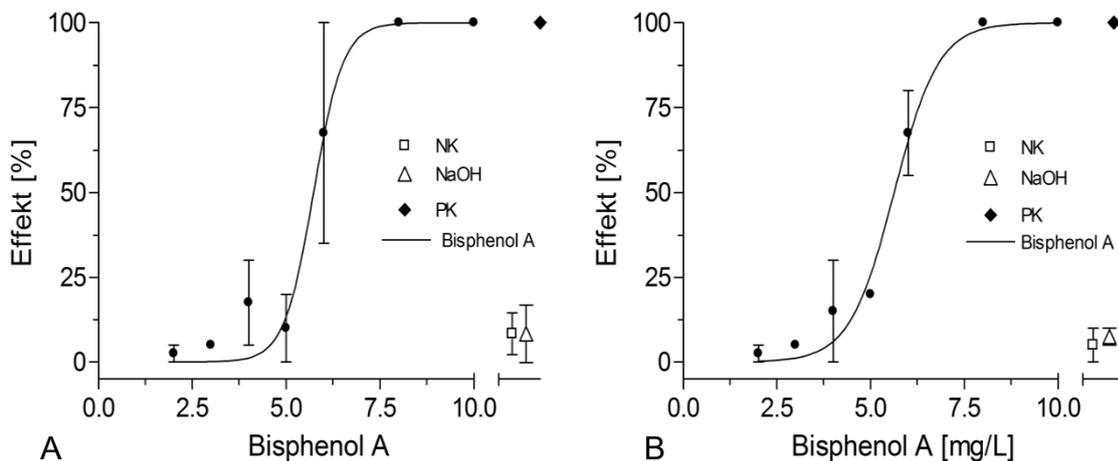


Abb. 19: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach 96 h (A) und 120 h (B) Exposition gegenüber Bisphenol A. Die Negativ- (NK), Lösungsmittel- (NaOH) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Eine gesteigerte Toxizität nach einer verlängerten Exposition ist kaum zu erkennen (B). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 2 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Bisphenol A zeigte als wichtigsten subletalen Effekt eine Entwicklungsverzögerung, die sich in einem verspäteten Schlupf äußerte. Ein ausbleibender Schlupf wird nach 96 h als Effekt gewertet, kann nach 120 h allerdings wieder aufgehoben werden. Ein interessanter Grenzwert scheint bei 6 mg/L nach 96 h zu sein, bei dem die Embryonen sehr unterschiedlich reagieren und äußere Umstände wie Temperatur, Stress und allgemeine Fitness eine entscheidende Rolle spielen. Die Variabilität der einzelnen Tests wird in der relativ hohen Standardabweichung von 32,5 % bei 6 mg/L deutlich. Allerdings ist hier anzumerken, dass die Graphen in Abb. 19 nur aus zwei Replikaten erstellt worden sind, da das 3. Replikat eine Mortalität in der NK > 10 % aufwies und somit aus der Auswertung genommen werden musste.

### 3.1.4 Aroclor 1254

Der gemittelte EC<sub>10</sub> für Aroclor1254 (Lot LB 77779V) lag nach einer 96 h-Exposition bei 3,86 ± 1,21 mg/L (n=3) und der Variationskoeffizient bei 31,32 % (Abb. 20). Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag nach einer 96 h-Exposition bei 6,77 ± 1,51 mg/L und der Variationskoeffizient bei 22,36 %. Mit längerer Expositionszeit nahm die Toxizität deutlich zu. Nach einer 120 h-Exposition lag der gemittelte EC<sub>10</sub> bei 2,98 ± 0,19 mg/L und der Variationskoeffizient bei 6,45 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei 3,86 ± 0,74 mg/L und der Variationskoeffizient bei 19,22 %.

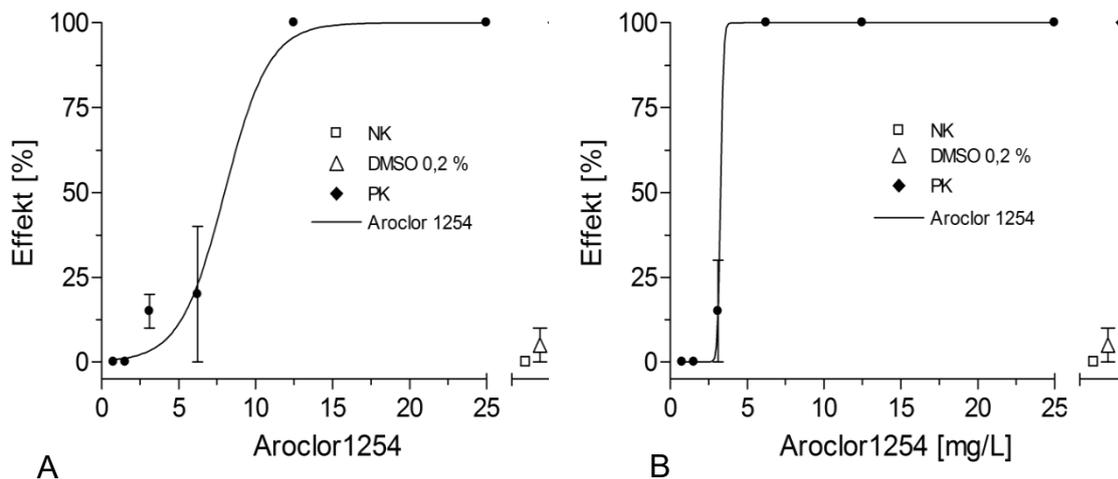


Abb. 20: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach 96 h (A) und 120 h (B) Exposition gegenüber Aroclor 1254. Die Negativ- (NK), Lösungsmittel- (DMSO 0,2%) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Die gesteigerte Toxizität nach einer verlängerten Exposition wird an der erhöhten Steigung der Kurve sichtbar (B). Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Aufgrund der hohen Unterschiede in der Toxizität von Aroclor 1254 wurden vergleichende Experimente mit Aroclor 1254 aus drei unterschiedlichen Chargen (Lot-Nr.: LB 89250V, LB 83748V, LB 77779V) durchgeführt. Es zeigten sich deutliche Abweichungen in den EC-Werten, wobei die Charge, die in diesem Projekt verwendet worden ist, die höchste Toxizität zeigte (Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht über die EC-Werte von Aroclor 1254 aus drei unterschiedlichen Chargen. Die höchste Toxizität zeigt die Charge LB 77779V, die auch in diesem Projekt von allen Verbundpartnern verwendet wurde.

	LB 89250V (4)	LB 83748V (1)	LB 77779V (3)
EC <sub>10</sub> (96h) [mg/L]	8,36 ± 3,02	5,582	3,86 ± 1,21
EC <sub>50</sub> (96h) [mg/L]	15,48 ± 1,76	10,063	6,77 ± 1,51

Auffällig war, dass alle Effekte erst nach dem Schlupf auftraten, so dass die Vermutung nahelag, dass Aroclor 1254 nicht durch das Chorion dringt. Dechorionierungsexperimente bestätigten dies (s. Abb. 21): Dechorionierte Embryonen (▲) zeigten deutliche früher Effekte als die noch chorionierten (■).

Im Allgemeinen waren die Effekte von Aroclor 1254 eher unspezifisch und ähnelten den beschriebenen subletalen Effekten nach einer Chlorpyrifos-Exposition.

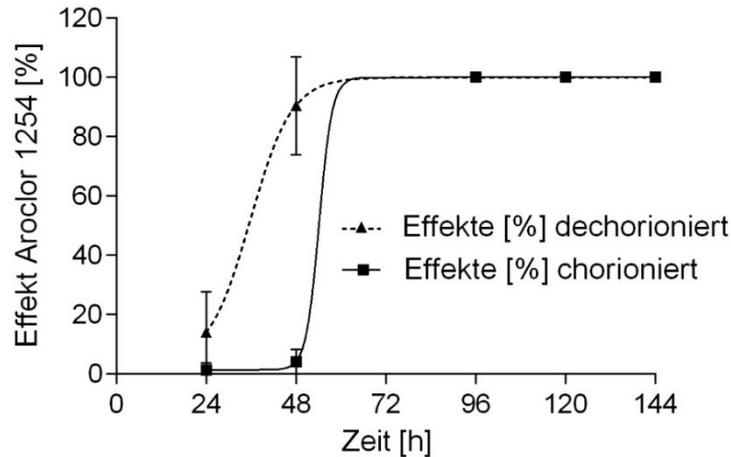


Abb. 21: Letale und subletale Effekte in chorionierten (■) und dechorionierten (▲) Embryonen des Zebraärbhlings (*Danio rerio*) über 144 h Exposition mit 25 mg/L Aroclor1254. Nur 5 % der chorionierten gegenüber 90 % der dechorionierten Embryonen zeigten nach 72 h Effekte, wohingegen die Effekte nach 96 h gegenüber chorionierten und dechorionierten Embryonen identisch waren. Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

### 3.1.5 Chinolin

Der gemittelte EC<sub>10</sub> für Chinolin lag nach 96 h Exposition bei 9,5 mg/L ± 2,11 (n=9) und der Variationskoeffizient bei 22,15 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag nach einer 96 h-Exposition bei 13,57 ± 2,61 mg/L und der Variationskoeffizient bei 19,23 %. Mit längerer Expositionszeit nahm die Toxizität nicht zu. Nach einer 120 h Exposition lag der gemittelte EC<sub>10</sub> bei 9,22 ± 1,8 mg/L und der Variationskoeffizient bei 19,54 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei 14,54 mg/L ± 2,16 mg/L und der Variationskoeffizient bei 14,87 % (Abb. 22).

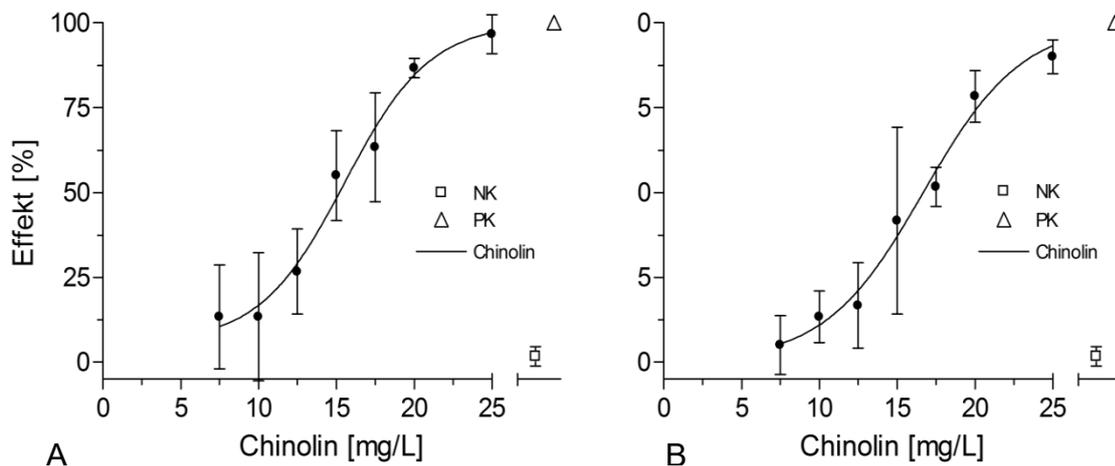


Abb. 22: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebraärbhlings (*Danio rerio*) nach 96 h (A) und 120 h (B) Exposition gegenüber Chinolin. Die Negativ- (NK) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Nach einer verlängerten Exposition ist keine Toxizitätssteigerung zu erkennen (B). Die Daten werden als Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Chinolin scheint besonders in den ersten 30 Minuten (4-er Zellstadium) der Embryonalentwicklung zu wirken. Versuche, in denen die Embryonen im 8er- und 16er-Zellstadium belastet wurden, zeigten bereits deutlich spätere und weniger ausgeprägte Effekte.

Bei einer noch späteren Exposition (4 h nach Befruchtung) konnten bei der gleichen Konzentration auch zu einem späteren Zeitpunkt keinerlei Effekte nachgewiesen werden. Somit scheint Chinolin v.a. in die ganz frühe Embryonalentwicklung einzugreifen.

Die Exposition mit Chinolin verursachte meist letale Effekte, die bereits 24 h nach der Befruchtung auftraten und über die Expositionsdauer nicht weiter zunahmen. Subletale Effekte wurden seltener beobachtet und zeigten sich bei den Embryonen in Form von verzögertem Schlupf, Wirbelsäulendeformationen und Ödemen.

### 3.1.6 2,3-Benzofuran

Der gemittelte  $EC_{10}$  für 2,3-Benzofuran lag nach einer 96 h-Exposition bei  $13,98 \pm 2,9$  mg/L ( $n=7$ ) und der Variationskoeffizient bei 20,74 %. Der gemittelte  $EC_{50}$  lag nach einer 96 h-Exposition bei  $18,62 \pm 1,94$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 10,4 %. Nach einer 120 h-Exposition lag der gemittelte  $EC_{10}$  etwas höher bei  $15,33 \pm 2,59$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 16,92 %. Der gemittelte  $EC_{50}$  lag ebenfalls höher bei  $20,52 \pm 1,35$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 6,56 %. 2,3-Benzofuran hat in den mittleren Konzentrationen vermehrt zu Ödemen und einem verzögerten Schlupf geführt, beides war allerdings oft nach 120 h wieder aufgehoben. Durch den späteren Schlupf kam es auch vermehrt zu Wirbelsäulenverkrümmungen, diese regenerierten sich ebenfalls nach 24 h, so dass die Effekte in den mittleren und niedrigeren Konzentrationen mit zunehmender Zeit eher abnahmen. Dies spiegelt sich in den erhöhten  $EC_{10}$ - und  $EC_{50}$ -Werten nach 120 h wider (Abb. 23).

Die durch 2,3-Benzofuran hervorgerufenen Effekte konnten meist in Form von Ödemen und Wirbelsäulenverkrümmungen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Chinolin, zeigte sich keine Abhängigkeit zum Expositionsbeginn, auch eine Exposition ab 4 h nach Fertilisation führten zu einer gleichbleibenden Mortalitätsrate.

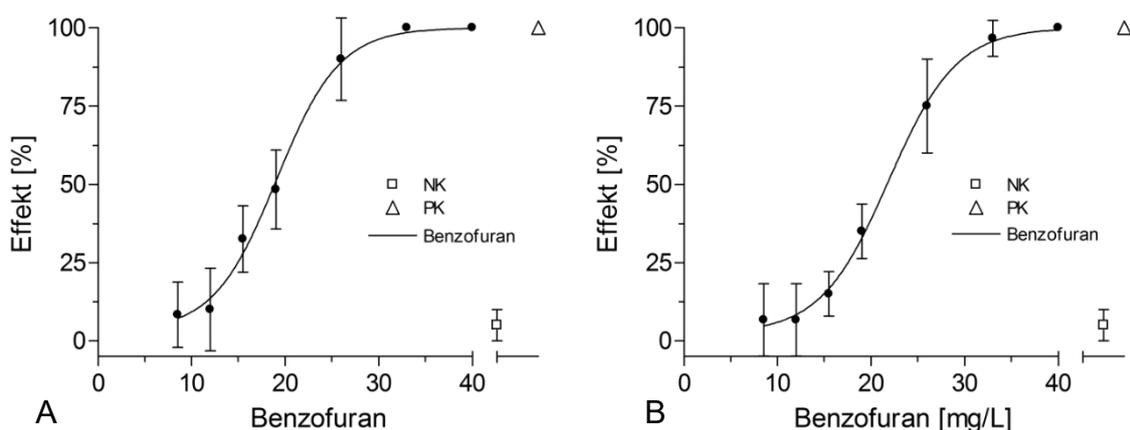


Abb. 23: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach 96 h (A) und 120 h (B) Exposition gegenüber 2,3- Benzofuran. Die Negativ- (NK) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Aufgrund von z. T. Regenerationen der Effekte in den mittleren Konzentrationen, kommt es nach 120 h zu einer leichten Abflachung der Kurve und stellt eine etwas verminderte Toxizität dar (B). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 3$  unabhängigen Durchläufen abgebildet.

### 3.1.7 Sedimentextrakte

#### Chemische Analyse der Sedimente

Insgesamt betrug der PAK-Gehalt aus den 40 analysierten PAKs ( $\Sigma$  40-PAH) im Sediment aus dem Veringkanal: 1606 mg/kg und unterstreicht den hohen Verschmutzungsgrad des Sediments. Der gesamte PAK-Gehalt von den Sedimenten aus Altrip und Ehrenbreitstein betrug 6 bzw. 9 mg/kg und lagen damit etwas um den Faktor 200 unter dem PAK-Gehalt der Sedimente aus dem Veringkanal. Die polychlorierten Biphenyle (PCB) aus den Sedimenten von Ehrenbreitstein lagen bei 149  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und aus Altrip bei 29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Die Dioxinkonzentrationen von dem Sediment aus Ehrenbreitstein und Altrip lagen ungefähr im gleichen Bereich bei 1,74 ng/kg. Die Probe aus dem Veringkanal konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

#### FET mit den Sedimentextrakten

Im Allgemeinen zeigten die Sedimentextrakte aus dem Veringkanal in allen Tests eine deutlich höhere Toxizität (ca. um Faktor 100) gegenüber den Sedimentextrakten aus Altrip und Ehrenbreitstein. Die hauptsächlichsten subletalen Effekte waren Perikardial- und Dottersacködeme, sowie charakteristische Kieferdeformationen und Abschnürungen vom Dottersackfortsatz (Abb. 24).



Abb. 24: Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach 96 h (A, B) und 120 h (C) Exposition gegenüber dem Sedimentextrakt aus Altrip mit 5 (A); 10 (B) und 20 (C) mg SEQ/ml. Nach 96 h waren deutliche Kieferdeformationen (roter Pfeil A, C), sowie Unterbrechungen im Dotterfortsatz (blauer Pfeil, B) zu sehen. Perikardialödeme (grüner Pfeil, C) zeigten sich bereits schon nach 48 h, die in ihrer Größe nach 120h deutlich zunahmen.

Im Detail: Der gemittelte  $EC_{10}$  für das Sedimentextrakt Altrip lag nach einer 96 h-Exposition bei  $3,33 \pm 0,7$  mg/L ( $n=3$ ) und der Variationskoeffizient bei 20,86 %. Der gemittelte  $EC_{50}$  lag nach einer 96 h-Exposition bei  $11,46 \pm 1,26$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 10,97 %. Nach einer 120 h-Exposition lag der gemittelte  $EC_{10}$  etwas niedriger bei  $3,29 \pm 0,78$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 23,79 %. Der gemittelte  $EC_{50}$  lag ebenfalls niedriger bei  $8,69 \pm 1,08$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 12,38 % (Abb. 25 A, B).

Der gemittelte  $EC_{10}$  für das Sedimentextrakt Ehrenbreitstein lag nach 96 h Exposition bei  $2,06$  mg/L  $\pm 0,22$  ( $n=3$ ) und der Variationskoeffizient bei 10,6 %. Der gemittelte  $EC_{50}$  lag nach einer 96 h-Exposition bei  $9,18 \pm 8,36$  mg/L und der Variationskoeffizient bei 91,03 %. Mit

längerer Expositionszeit nahm die Toxizität nicht zu. Nach einer 120 h Exposition lag der gemittelte EC<sub>10</sub> bei 2,16 ± 0,35 mg/L und der Variationskoeffizient bei 16,3 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei 22,47 mg/L ± 25,77 mg/L und der Variationskoeffizient bei 114,68 % (Abb. 25 B, C).

Der gemittelte EC<sub>10</sub> für das Sedimentextrakt aus dem Veringkanal lag nach einer 96 h-Exposition bei 0,033 ± 0,063 mg/L (n=3) und der Variationskoeffizient bei 18,73 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag nach einer 96 h-Exposition bei 0,07 ± 0,007 mg/L und der Variationskoeffizient bei 9,83 %. Mit längerer Expositionszeit nahm die Toxizität nur im geringen Maße zu. Nach einer 120 h-Exposition lag der gemittelte EC<sub>10</sub> weiterhin bei 0,03 ± 0,005 mg/L und der Variationskoeffizient bei 16,06 %. Der gemittelte EC<sub>50</sub> lag bei 0,043 ± 0,016 mg/L und der Variationskoeffizient bei 37,25 % (Abb. 25 E, F). Vergleicht man die EC-Werte der einzelnen Standorte (Tab. 8 und Tab. 9), so ergibt sich eine Toxizität in folgender Reihenfolge:

**Veringkanal >>> Ehrenbreitstein > Altrip**

Anzumerken ist allerdings, dass der Test mit dem Sedimentextrakt aus Ehrenbreitstein bei der EC<sub>50</sub> Bestimmung nach 96 h sowohl auch nach 120 h einen sehr hohen Variationskoeffizienten aufweist und somit nur eine eingeschränkte Aussagekraft hat (Tab. 8 und Tab. 9).

Tab. 8: EC<sub>10</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte für die Wirkung der Sedimentextrakte auf Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) mit den jeweiligen Standardabweichungen und Variationskoeffizienten **nach 96 h**.

Sedimentextrakt [n=3]	EC <sub>10</sub>	Standard-	Variations-	EC <sub>50</sub>	Standard-	Variations-
	[mgSEQ/ml] 96 h	abweichung [mgSEQ/ml]	Koeffizient [%]		[mgSEQ/ml]	abweichung [mgSEQ/ml]
Altrip	3,33	0,7	20,86	11,46	1,26	10,97
Ehrenbreitstein	2,06	0,22	10,6	9,18	8,36	91,03
Veringkanal	0,033	0,0063	18,73	0,07	0,007	9,83

Tab. 9: EC<sub>10</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte für die Wirkung der Sedimentextrakte auf Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) mit den jeweiligen Standardabweichungen und Variationskoeffizienten **nach 120 h**.

Sedimentextrakt [n=3]	EC <sub>10</sub>	Standard-	Variations-	EC <sub>50</sub>	Standard-	Variations-
	[mgSEQ/ml] 120 h	abweichung [mgSEQ/ml]	Koeffizient [%]		[mgSEQ/ml]	abweichung [mgSEQ/ml]
Altrip	3,29	0,78	23,79	8,69	1,08	12,38
Ehrenbreitstein	2,16	0,35	16,3	22,47	25,77	114,68
Veringkanal	0,03	0,005	16,06	0,043	0,016	37,25

Die zusammengestellten Graphen in Abb. 25 zeigen für alle drei Sedimentextrakte recht ähnliche Tendenzen. Altrip zeigt den flachsten Kurvenverlauf und somit die niedrigste Toxizität. Ehrenbreitstein zeigt, wie bereits oben erwähnt, eine sehr hohe Standardabweichung und somit eine hohe Variabilität in den Ergebnissen. Aber dennoch ist ein steilerer Anstieg der Kurve von Ehrenbreitstein gegenüber Altrip deutlich zu erkennen. Mit großem Abstand zeigen allerdings die Kurven vom Veringkanal die höchsten Steigungen. Vergleicht man die Skalierung der x-Achsen, dann fallen einem die viel niedrigeren Konzentrationsbereiche beim Veringkanal auf und unterstreichen ebenfalls noch einmal das hohe Toxizitätspotenzial von dieser Sedimentprobe.

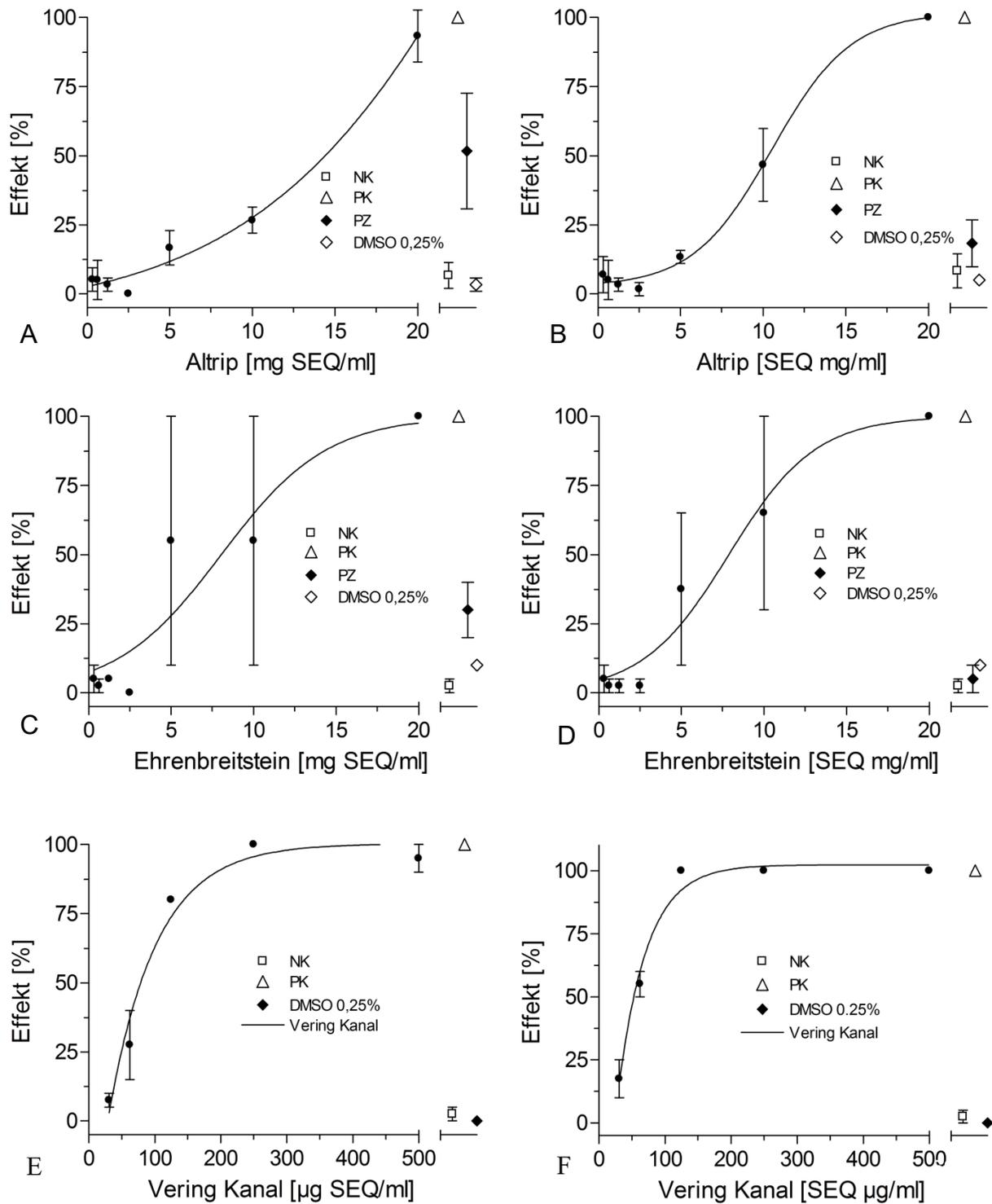


Abb. 25: Letale und subletale Effekte bei Embryonen des Zebraärbflings (*Danio rerio*) nach 96 h (A, C, E) und 120 h (B, D, F) Exposition gegenüber den Sedimentextrakten Altrip (A, B); Ehrenbreitstein (C, D) und Veringkanal (E, F). Die Negativ- (NK) Lösungsmittel- (DMSO 0,25 %), Prozess- (PZ) und Positivkontrollen (3,4 Dichloranilin; PK) sind jeweils am rechten Ende der x-Achse gezeigt. Die höchste Steigung zeigt sich im Veringkanal (E, F) und die niedrigste bei Altrip (A, B). Ehrenbreitstein (C, D) zeigt eine etwas höhere Toxizität als Altrip. Die Prozesskontrolle von Altrip liegt deutlich über der Lösungsmittel- und der Negativkontrolle. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Durchläufen abgebildet.

Auffällig ist, dass v.a. die Prozesskontrolle von Altrip trotz der hohen Standardabweichung noch deutlich über der Negativ- und Lösungsmittelkontrolle liegt. Auch die Prozesskontrolle von Ehrenbreitstein liegt etwas höher als die Kontrollen. Aufgrund von technischen Problemen gab es keine Prozesskontrolle für den Veringkanal, so dass man hier keinen Vergleich ziehen kann.

Im Allgemeinen zeigten alle Sedimentextrakte aus allen Probeentnahmestellen ein embryotoxisches Potential für den Zebraquarienfisch mit einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit mit der Zeit.

Das Sedimentextrakt aus dem Veringkanal produzierte nicht nur die stärkste akute Toxizität, sondern verursachte auch eine Vielzahl von unspezifischen subletalen Effekten. Unspezifische subletale Effekte wurden jedoch auch für die anderen Extrakte beobachtet, insbesondere nach 96 h Exposition. Die am häufigsten beobachteten Effekte waren Ödeme im Perikard (Abb. 24 C) und/oder Dottersack, fehlende Durchblutung, reduzierter Herzschlag und verzögerter Schlupf. Spezifischere Effekte wie Wirbelsäulenverkrümmung (Lordose; Abb. 24 A), charakteristische Kiefferverformungen (Abb. 24 A) und Verengung des Dotterfortsatzes (Abb. 24 B) konnten nur bei den weniger toxischen Sedimentextrakten Altrip und Ehrenbreitstein beobachtet werden. Ein Mangel an Augen- und Hautpigmentierung nach einer 48 h Exposition war ab einer gewissen Konzentration für alle drei Sedimentextrakte charakteristisch: Altrip  $\geq 12,5$  mg SEQ/ml; Ehrenbreitstein  $\geq 25$  mg SEQ/ml und Veringkanal  $\geq 0,4$  mg SEQ/ml.

Zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen waren auch neurologische Effekte v.a. nach der Exposition mit dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal ( $\geq 0,2$  mg SEQ/ml) erkennbar. Die Embryonen zeigten nach 96 h Exposition, ähnlich wie oben für Chlorpyrifos beschrieben, schnelle Schwimmbewegungen mit unkontrollierten Zuckungen, die bis hin zur Paralyse führen konnten.

### **Zusammenfassung**

Die gesamten Ergebnisse des FETs sind in Tab. 10 zusammengefasst. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen noch einmal die Wichtigkeit der Kenntnis über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Testsubstanzen. Die Lipophilie, ausgedrückt in dem  $\log K_{ow}$ , erwies sich als ein entscheidender Parameter für die Anwendung des FETs. Eine Akkumulation von Substanzen mit einem hohen  $\log K_{ow}$  spiegeln sich in einer verzögerten Toxizität, z.B. von Aroclor 1254 oder Chlorpyrifos und waren mit einer erhöhten Toxizität bei längerer Exposition verbunden. Des Weiteren zeigten die semi-statischen Testsysteme und die 24 h vorinkubierten Wellplatten stabilere Konzentrationen und ermöglichten auch in niedrigeren Konzentrationen zuverlässige Ergebnisse zu bekommen. Im Allgemeinen sollte die Durchführung des FETs sehr konservativ ablaufen, da kleine Abweichungen, z.B. eine verzögerte Exposition der Embryonen, zu falschen Ergebnissen führen kann. Letztendlich zeigt die vorliegende Studie, dass Konzentrationen im  $EC_{10}$ -Bereich bereits ausreichend hohe Konzentrationen darstellen, um spezifische Stressreaktionen auszulösen.

Tab. 10: Übersicht über die ermittelten EC<sub>10</sub> und EC<sub>50</sub>-Werte von 96 h alten Embryonen des Zebraärlings.

	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	Lösungsmittel
<b>Monosubstanzen (mg/L)</b>			
Aroclor 1254 (n = 3)	3,86 ± 1,21	6,77 ± 1,51	0,2 % DMSO
Bisphenol A (n = 4)	3,84 ± 0,58	5,91 ± 0,66	NaOH
Chlorpyrifos (n = 3)	0,62 ± 0,13	1,11 ± 0,15	0,1 % DMSO
Methylquecksilberchlorid (n = 5)	0,031 ± 0,005	0,037 ± 0,903	KW
2,3-Benzofuran (n = 8)	13,98 ± 2,91	18,62 ± 1,94	KW
Chinolin (n = 9)	9,5 ± 2,11	13,57 ± 2,61	KW
<b>Sedimentextrakte (mg SEQ/ml)</b>			
Altrip (n = 3)	3,33 ± 0,70	11,46 ± 1,26	0,25 % DMSO
Ehrenbreitstein (n = 3)	2,06 ± 0,22	9,18 ± 8,36	0,25 % DMSO
Veringkanal (n = 3)	0,033 ± 0,006	0,070 ± 0,007	0,25 % DMSO

KW: Kunstwasser; NaOH: Natriumhydroxid, SEQ: sediment equivalent.

## 3.2 Live-Imaging-EROD-Assay

### 3.2.1 CYP1A-Induktion in der Embryonalentwicklung

Der Text des folgenden Abschnitts 3.2.1 und 3.23.2.2 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo EROD assays with the zebrafish (Danio rerio) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity* ” Sci Total Environ 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Um das zeitliche Muster der CYP1A-Induktion während der Embryonalentwicklung zu charakterisieren, wurden verschiedene Entwicklungsstadien untersucht und aufgenommen. Abb. 26 veranschaulicht die *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivität bei Embryonen des Zebraärlings nach 24, 48, 72, 96 und 120 h. Jedes Entwicklungsstadium wurde jeweils mit der konstitutiven (basalen) Aktivität (hier als Negativkontrolle, NK bezeichnet) und der maximalen EROD-induzierenden Kontrolle, 10 µg/L β-Naphthoflavon (β-NF), abgebildet.

Nach 24 h Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon zeigten die Embryonen ein deutliches Signal im Gehirn, den Augen und Otolithen (Abb. 26). Nach 48 h Exposition nahm das Signal im Gehirn und in den Augen wieder ab, während das Signal in den Otolithen anhielt. Erst nach 72 h zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal in einem kleinen, genau definierten Bereich des Lebergewebes (Abb. 26). Mit zunehmender Expositionszeit (96 und 120 h) nahmen Fläche und Signalintensität in dem Lebergewebe insbesondere in der β-Naphthoflavon-Exposition deutlich zu. Mit fortschreitender Entwicklung überstrahlt das Fluoreszenzsignal des Darms das Signal des Lebergewebes, da sich Resorufin über die Gallenflüssig im Darm ansammelt, der sich unmittelbar unterhalb des Lebergewebes befindet. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Differenzierung zwischen den beiden Organen, daher werden beide Begriffe, Darm und Leber, im folgenden Text synonym verwendet. Im Allgemeinen zeigte sich jeweils das gleiche Muster der Induktion, nur um ein Vielfaches schwächer, auch bei der jeweiligen Negativkontrolle, und spiegelt die basale Aktivität wider, die auch als Grundinduktion bezeichnet wird.

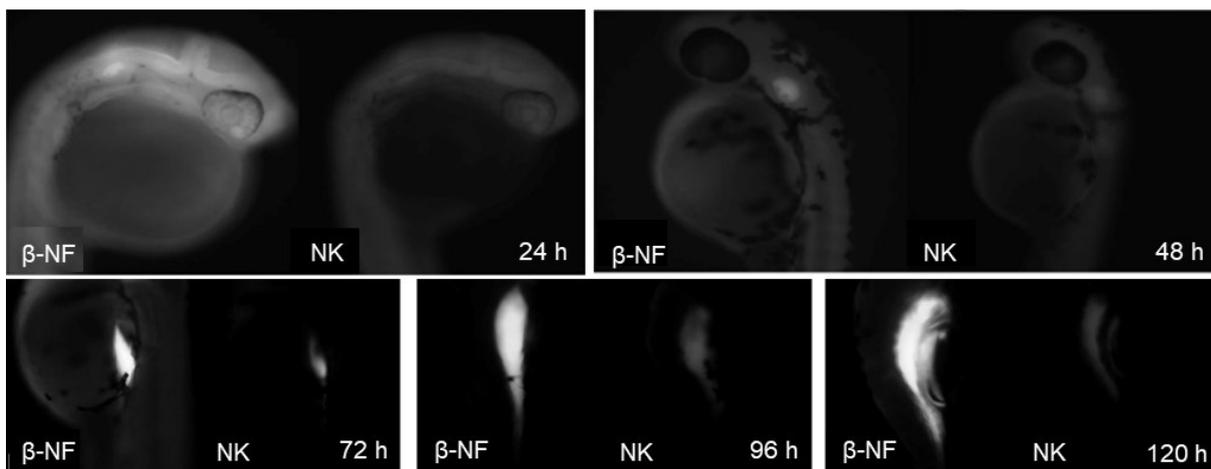


Abb. 26: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Induktionsmuster im Embryo des Zebraärlings (*Danio rerio*) nach einer 24-, 48-, 72-, 96- und 120 h-Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (β-NF, maximale EROD-Induktion) und Kunstwasser (NK, Negativkontrolle). Nach 24 und 48 h Exposition zeigen die Embryonen hauptsächlich Signale im Gehirn, Augen und Otolithen, während nach 72, 96 und 120 h die Embryonen vorwiegend EROD-Aktivitäten im Lebergewebe zeigen. Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

### 3.2.2 Modifizierung des EROD-Assays

Regelmäßig wurde in 120 h alten Larven ein zusätzliches Signal neben dem Signal der Leber und des Darmlumens beobachtet (Abb. 27 A \*). Um diese Struktur zu identifizieren, wurden ausgewählte Larven mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Konfokalbilder ergaben, dass es sich hierbei vermutlich um eine Spiegelung handelt. Das Darmlumen, das nach 120 h einen sehr hohen Gehalt an Resorufin aufweist und somit eine starke Fluoreszenzkraft besitzt, spiegelt sich an der Wand von der luftgefüllten Schwimmblase (Abb. 27 B). Da diese Reflektionen die Beobachtungen in der vorliegenden Studie nicht beeinflussten, wurden sie nicht weiter berücksichtigt.

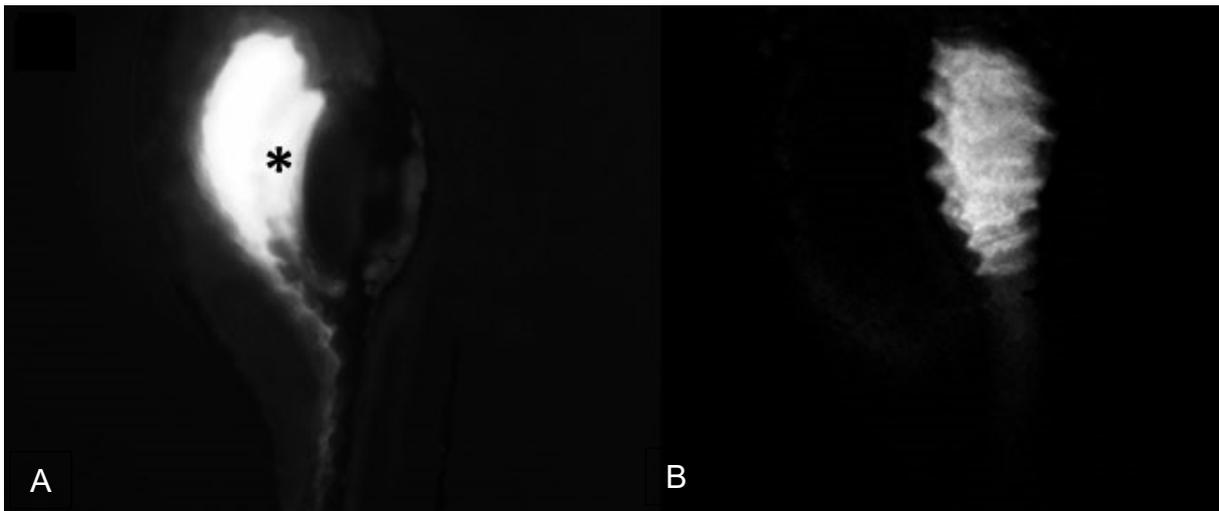


Abb. 27: Ein Vergleich der *In vivo* EROD-Induktion im selben Embryo des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach 120 h mit dem Epifluoreszenzmikroskop (A) und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (B) aufgenommen. Nur die Aufnahme mit dem Epifluoreszenzmikroskop liefert das beschriebene zusätzliche Signal (\*) und resultiert vermutlich aus einer Reflektion, da es in der konfokalen Aufnahme nicht mehr zu sehen ist (B). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms; Konfokalmikroskopie, Laser: 100 %, HV: 36. Abb. von Franziska Scheller.

Um eventuelle Schwankungen der CYP1A-Aktivität aufgrund längerer Exposition, z.B. durch Akkumulation von Xenobiotika im Gewebe über die Zeit zu vermeiden, wurde die Expositionszeit von älteren Embryonen ( $\geq 72$  h) systematisch auf 3 h reduziert. Exemplarisch wurde dies zunächst mit  $10 \mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavon durchgeführt. Ein Vergleich der 3 h (Abb. 28 A-C) und der kontinuierlichen Exposition (Abb. 28 D-F) zeigte nahezu keine Unterschiede in der Signalintensität über die Zeit, mit Ausnahme der kontinuierlichen 120 h-Exposition (Abb. 28 C, F), die etwas schwächer ausfiel. Auffällig war auch, dass der Fluoreszenzbereich in der Leber bei der Kurzzeitbelastung durchweg kleiner war und präzisere Konturen abbildete als nach einer Langzeit-Belastung.

Des Weiteren wurde die Autofluoreszenz des Lösungsmittels DMSO untersucht. Es zeigten sich minimale Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, sodass alle nachfolgenden Messungen innerhalb einer Versuchsreihe einer Monosubstanz oder der Sedimente die gleichen DMSO Konzentrationen aufwiesen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden bei den folgenden Bildtafeln anstatt der Negativkontrolle die entsprechende Lösungsmittelkontrolle abgebildet.

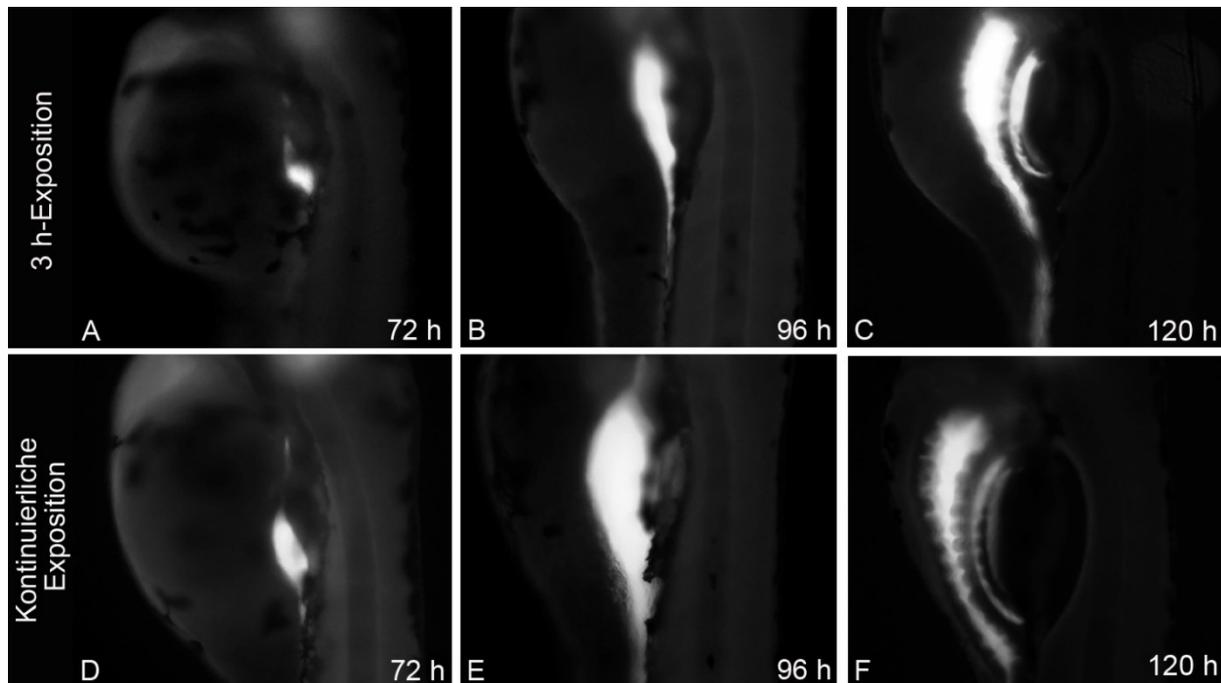


Abb. 28: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten im Embryo des Zebrafischarbings (*Danio rerio*) nach einer 3 h (A-C) und einer kontinuierlichen Exposition (D-F) von 72 (A, D), 96 (B, E) und 120 h (C, F) alten Embryonen gegenüber  $10 \mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavon. In allen Entwicklungsstadien zeigen die Embryonen mit der Kurzzeit-Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon (A-C) keine Unterschiede in der Signalintensität zur kontinuierlichen Exposition (D-F). Eine Ausnahme bildet die Langzeit-Exposition nach 120 h, die ein etwas schwächeres Signal abbildet. Anzahl der Experimente:  $n=12$  mit jeweils 4-6 Embryonen. Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

### 3.2.3 Methylquecksilberchlorid im EROD-Assay

Methylquecksilberchlorid erzeugte in keiner Konzentration und in keinem Entwicklungsstadium eine CYP1A- Induktion oder -Inhibierung.

### 3.2.4 Chlorpyrifos im EROD-Assay

Der Text des folgenden Abschnitts 3.23.2.4 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*” Sci Total Environ; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Nach einer 72 h-Exposition mit  $\beta$ -Naphthoflavon (Abb. 29 A) zeigten die Embryonen ein deutliches Signal in der Leber, das nach 96 h in Fläche und Signalstärke deutlich zunahm (Abb. 29 B), aber nach 120 h abnahm (Abb. 29 C). In der Lösungsmittelkontrolle zeigten die Embryonen ein ähnliches Induktionsmuster mit niedrigeren Signalintensitäten (Abb. 29 D-F). Die Exposition mit 0,6 mg/L Chlorpyrifos als Monosubstanz zeigte nur ein sehr schwaches Signal nach 72 h und nach 96 und 120 h war es kaum noch nachweisbar. Genauer gesagt, war die Induktion noch geringer als die der Lösungsmittelkontrolle und ließ auf eine inhibierende Wirkung schließen. Um eine mögliche Hemmung von Cytochrome P450 durch Chlorpyrifos zu bestätigen, wurde ein Kombinationsversuch mit 0,6 mg/L Chlorpyrifos plus 10  $\mu$ g/L  $\beta$ -Naphthoflavon durchgeführt. Wie in Abb. 29 J-L ersichtlich, wird das EROD-Signal nach 72 h deutlich abgeschwächt und ist nach 96 und 120 h nicht mehr nachweisbar.

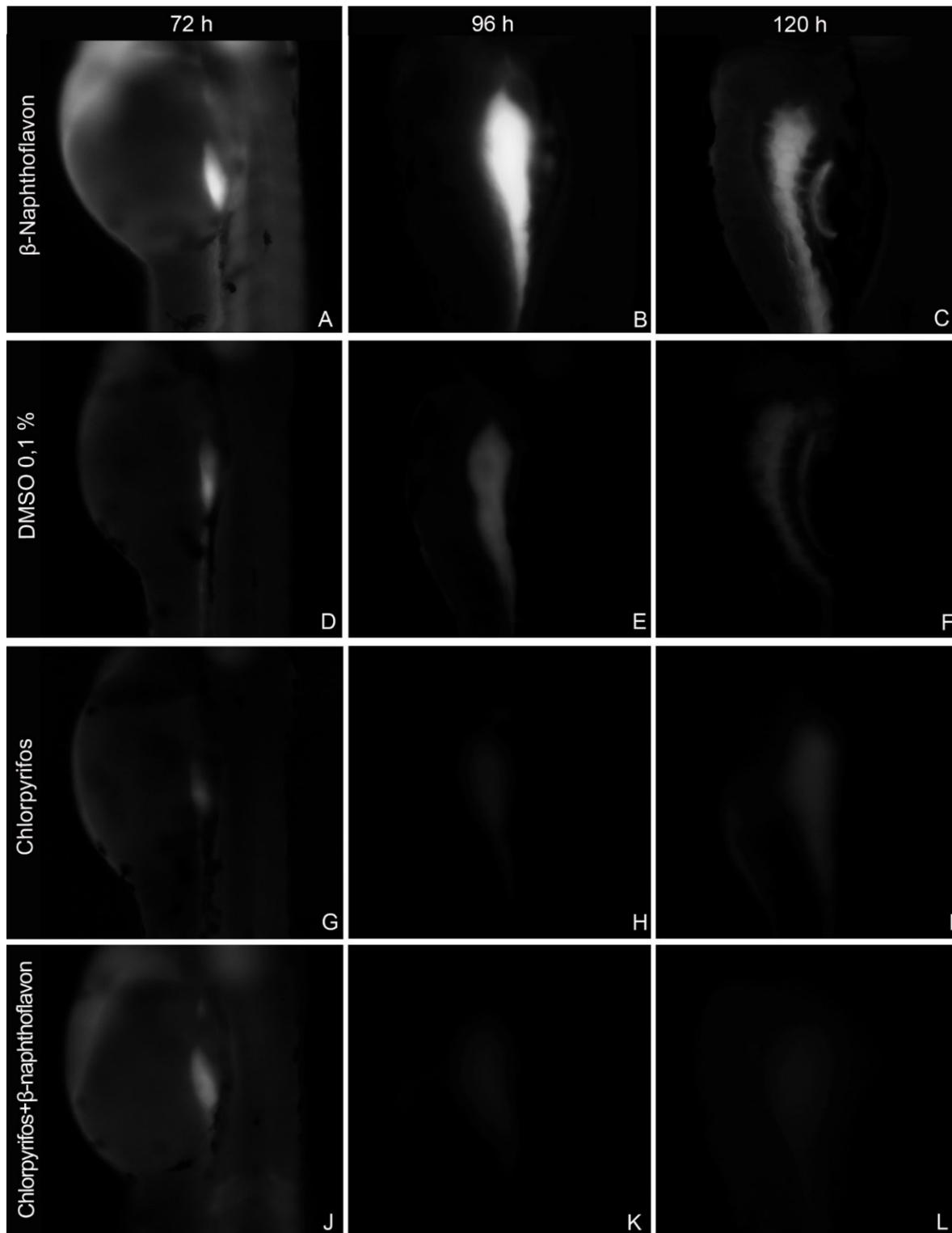


Abb. 29: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Induktionsmuster im Embryo des Zebrafärblings (*Danio rerio*) nach 72 (A, D, G, J), 96 (B, E, H, K) und 120 h (C, F, I, L) Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C) Lösungsmittel DMSO 0,1 % (D-F), 0,6 mg/L Chlorpyrifos (G-I) und 0,6 mg/L Chlorpyrifos + β-Naphthoflavon (J-L). In allen Entwicklungsstadien zeigen Embryonen nach einer β-Naphthoflavon-Exposition ein helles Signal in der Leber, während Embryonen der Lösungsmittelkontrolle ein schwächeres Signal in der Leber zeigen. Die Signalintensitäten nach einer Chlorpyrifos-Exposition als Monosubstanz sowie auch nach einer Koexposition mit β-Naphthoflavon zeigen nach 96 und 120 h niedrigere Werte als in der Lösungsmittelkontrolle. Eine Ausnahme zeigt das Signal im Koexpositionsansatz nach 72 h, welches die gleiche Intensität wie bei der Lösungsmittelkontrolle aufweist. Epifluoreszenzmikroskopie; Belichtungszeiten: 60 ms (72 h), 30 ms (96 h), 40 ms (120 h).

### Chlorpyrifos in verschiedenen Konzentrationen

Um eine Dosis-Wirkungs- Beziehung in Bezug auf die inhibierende Wirkung von Chlorpyrifos auf das CYP1A zu untersuchen, wurden Embryonen mit 0,25, 0,5 und 1 mg/L Chlorpyrifos in Kombination mit 10 µg/L β-Naphthoflavon exponiert. Insbesondere nach 96 und 120 h waren die Signalintensitäten nach der Koexposition mit 0,5 und 1 mg/L Chlorpyrifos + 10 µg/L β-Naphthoflavon (Abb. 31 J-O) niedriger als in der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 31 D-F). Im Gegensatz dazu inhibierte die niedrigste Konzentration von 0,25 mg/L Chlorpyrifos + 10 µg/L β-Naphthoflavon (Abb. 31 G-I) die EROD Aktivität nicht vollständig. Diese Ergebnisse bestätigen die selektive zeit- und dosisabhängige Hemmung von Cytochrome P450 durch Chlorpyrifos in Embryonen des Zebraärlings.

Die densitometrische Quantifizierung der Fluoreszenz nach einer β-Naphthoflavon-Exposition dokumentiert eine zeitabhängige Reduktion der EROD-Induktion mit gemittelten Grauwerten von ca. 40.000, 20.000 und 10.000 Einheiten nach 72, 96 und 120 h (Abb. 30). Ebenso nahm die basale EROD-Aktivität der Lösungsmittelkontrolle von 72 auf 120 h ab und zeigte sich in gemittelten Grauwerten deutlich unter < 10.000 Einheiten. Die Embryonen zeigten in allen Entwicklungsstadien sowie in allen Konzentrationen von Chlorpyrifos + 10 µg/L β-Naphthoflavon einen signifikanten Unterschied zu β-Naphthoflavon als Monosubstanz und bestätigen eine Abnahme der Signalstärke, die sich in gemittelten Grauwerten von ≤ 5.000 Einheiten abbildete. Eine Ausnahme war bei dem Lösungsmittel DMSO 0,1 % zu beobachten, das nur bei den 72 h alten Embryonen einen signifikanten Unterschied zu β-Naphthoflavon ( $\alpha < 0,05$ ) aufwies.

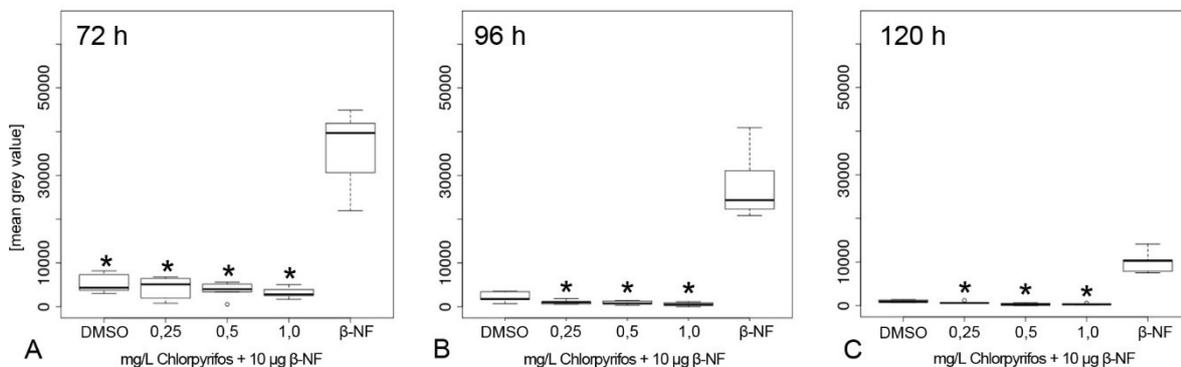


Abb. 30: Das EROD-Induktionspotential in 72 (A), 96 (B) und 120 h (C) alten Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*), grafisch dargestellt als mittlere Intensität der Fluoreszenz (n=4-6), die über Grauwert-Bestimmung mithilfe der Software NIS-Elements 4.0 ermittelt worden ist. Die Embryonen wurden kontinuierlich gegenüber DMSO 0,1 %, 0,25, 0,5 und 1,0 mg/L Chlorpyrifos + β-NF und β-Naphthoflavon als Monosubstanz exponiert. Die EROD-Aktivitäten werden als Box-Plots für drei unabhängige Läufe (n=3) pro Konzentration angegeben, die jeweils von 4-6 Embryonen stammen. Die Boxplots zeigen die Mediane, 25 % und 75 % Perzentile (obere und untere Grenze des Balkens) und Ausreißer > 5 % und 95 % Perzentile (°) an. (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zu β-Naphthoflavon (Leven-Test:  $\alpha < 0,05$ ). Alle Embryonen zeigten nach einer kombinierten Chlorpyrifos-Exposition in allen Entwicklungsstadien einen signifikanten Unterschied in der Signalintensität im Vergleich zu β-Naphthoflavon als Monosubstanz an.

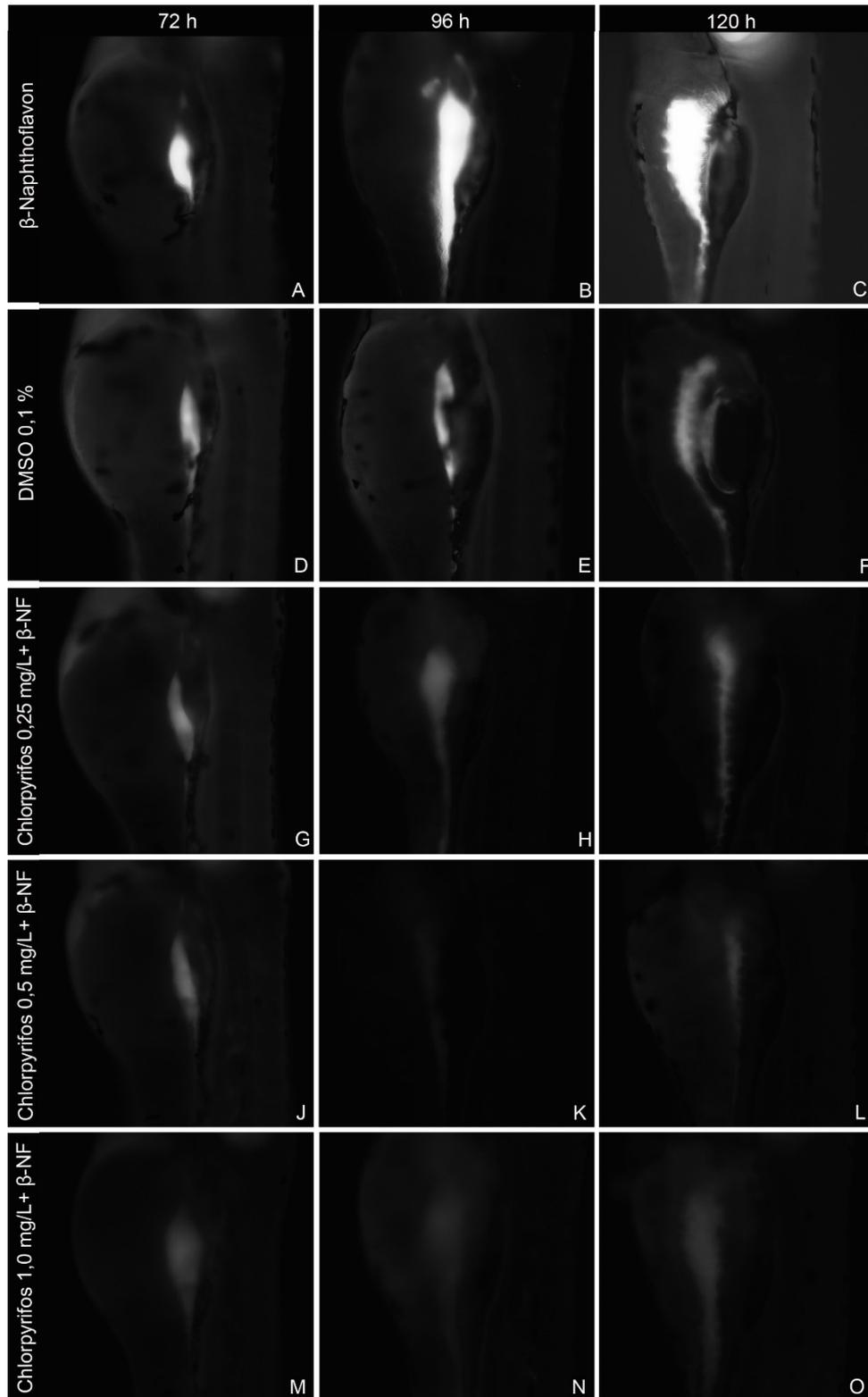


Abb. 31: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten im Embryo des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach 72 (A, D, G, J, M), 96 (B, E, H, K, N) und 120 h (C, F, I, L, O) Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C) Lösungsmittel DMSO 0,1 % (D-F), 0,25 (G-I), 0,5 (J-L) und 1,0 mg/L Chlorpyrifos (M-O) + jeweils 10 µg/L β-Naphthoflavon. In allen Entwicklungsstadien zeigen Embryonen nach einer β-Naphthoflavon-Exposition ein helles Signal in der Leber, während Embryonen der Lösungsmittelkontrolle ein schwächeres Signal in der Leber zeigen. Insbesondere nach 96 und 120 h waren die Signalintensitäten nach einer Koexposition mit 0,5 und 1,0 mg/L Chlorpyrifos + 10 µg/L β-NF niedriger als in der Lösungsmittelkontrolle, während die niedrigste Konzentration von 0,25 mg/L Chlorpyrifos + β-NF die EROD-Aktivität nicht vollständig inhibierte (G-I). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeiten: 40 ms (72 h), 100 ms (96 h), 100 ms (120 h).

### Live-Imaging-EROD-Assay nach einer 3 h Kurzzeit- Exposition mit Chlorpyrifos + $\beta$ -NF

Um Schwankungen der CYP1A-Aktivität aufgrund längerer Exposition (z.B. durch Akkumulation von Chlorpyrifos im Gewebe) zu vermeiden und um die zeitabhängige EROD-Induktionsaktivität weiter zu untersuchen, wurde der Expositionszeitraum auf 3 h reduziert. Es wurden jeweils 72 (Abb. 33 A, D, G, J) 96 (Abb. 33 B, E, H, K) und 120 h (Abb. 33 C, F, I, L) alte Embryonen gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon (Abb. 33 A-C), DMSO 0,1 % (Abb. 33 D-F), Chlorpyrifos +  $\beta$ -NF (Abb. 33 G-I) und zum Vergleich wurden Chlorpyrifos +  $\beta$ -NF auch als kontinuierliche Exposition, parallel untersucht (Abb. 33 J-L). Die Kurzzeit-Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon (Abb. 33 A-C) und der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 33 D-F) ergaben die gleichen Induktionsmuster wie nach einer kontinuierlichen Exposition (vgl. Abb. 29 A-F). Ebenso zeigte der Vergleich der 3 h-Exposition (Abb. 33 G-I) gegenüber der kontinuierlichen Exposition (Abb. 33 J-L) nur minimale Unterschiede in der Signalintensität. Eine Ausnahme bildeten die 72 h alten Embryonen in der Kurzzeit-Exposition (Abb. 33 G), die eine stärkere EROD Induktion aufwiesen als die in der kontinuierlichen Exposition (Abb. 33 J). In 96 und 120 h alten Embryonen waren allerdings die EROD-Aktivitäten nach beiden Expositionsszenarien vollständig gehemmt (Abb. 33 H-I und K-L).

Die densitometrische Quantifizierung der Fluoreszenz nach einer drei stündigen  $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition ergab unabhängig von dem Entwicklungsstadium gemittelte Grauwerte von 20.000 – 15.000 Einheiten (Abb. 32). Im Vergleich zu der kontinuierlichen Exposition zeigte die 3 h-Exposition im Allgemeinen eine geringere hemmende Wirkung, insbesondere in dem jüngsten Stadium von 72 h. Einen signifikanten Unterschied zu  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz zeigte sich nur in der höchsten Konzentration von 1 mg/L und nach 120 h bei 0,5 mg/L Chlorpyrifos +  $\beta$ -NF (Abb. 32). Die mittleren Grauwerte der Lösungsmittelkontrolle waren in allen Entwicklungsstadien  $\leq 5000$  Einheiten und zeigten kontinuierlich einen signifikanten Unterschied zur maximalen Induktion von  $\beta$ -Naphthoflavon (Levene-Test  $\alpha < 0,05$ ).

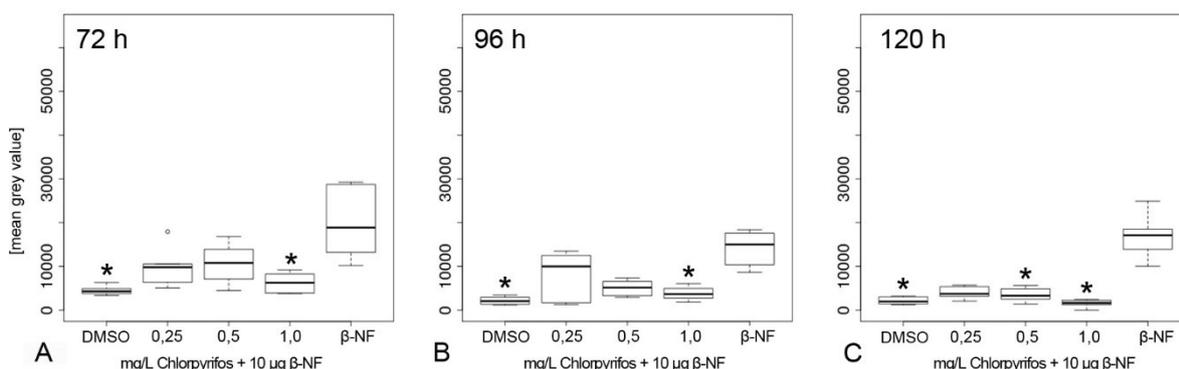


Abb. 32: Das EROD-Induktionspotential in 72 (A), 96 (B) und 120 h (C) alten Embryonen des Zebraäbrlings (*Danio rerio*), grafisch dargestellt als mittlere Intensität der Fluoreszenz ( $n=4-6$ ), die über Grauwert-Bestimmung mithilfe der Software NIS-Elements 4.0 ermittelt worden ist. Die Embryonen wurden **über 3 h** gegenüber DMSO 0,1 %, 0,25, 0,5 und 1,0 mg/L Chlorpyrifos +  $\beta$ -NF und  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz exponiert. Die EROD-Aktivitäten werden als Box-Plots für drei unabhängige Läufe ( $n=3$ ) pro Konzentration angegeben, die jeweils von 4-6 Embryonen stammen. Die Boxplots zeigen die Mediane, 25 % und 75 % Perzentile (obere und untere Grenze des Balkens) und Ausreißer  $> 5$  % und 95 % Perzentile ( $^{\circ}$ ) an. (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zu  $\beta$ -Naphthoflavon (Leven-Test:  $\alpha < 0,05$ ). Einen signifikanten Unterschied zu  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz zeigte sich nur in der höchsten Konzentration von 1 mg/L und nach 120 h bei 0,5 mg/L Chlorpyrifos +  $\beta$ -NF. Insgesamt zeigt sich im Verhältnis eine höhere Fluoreszenzintensität, insbesondere bei 72 h alten Embryonen.

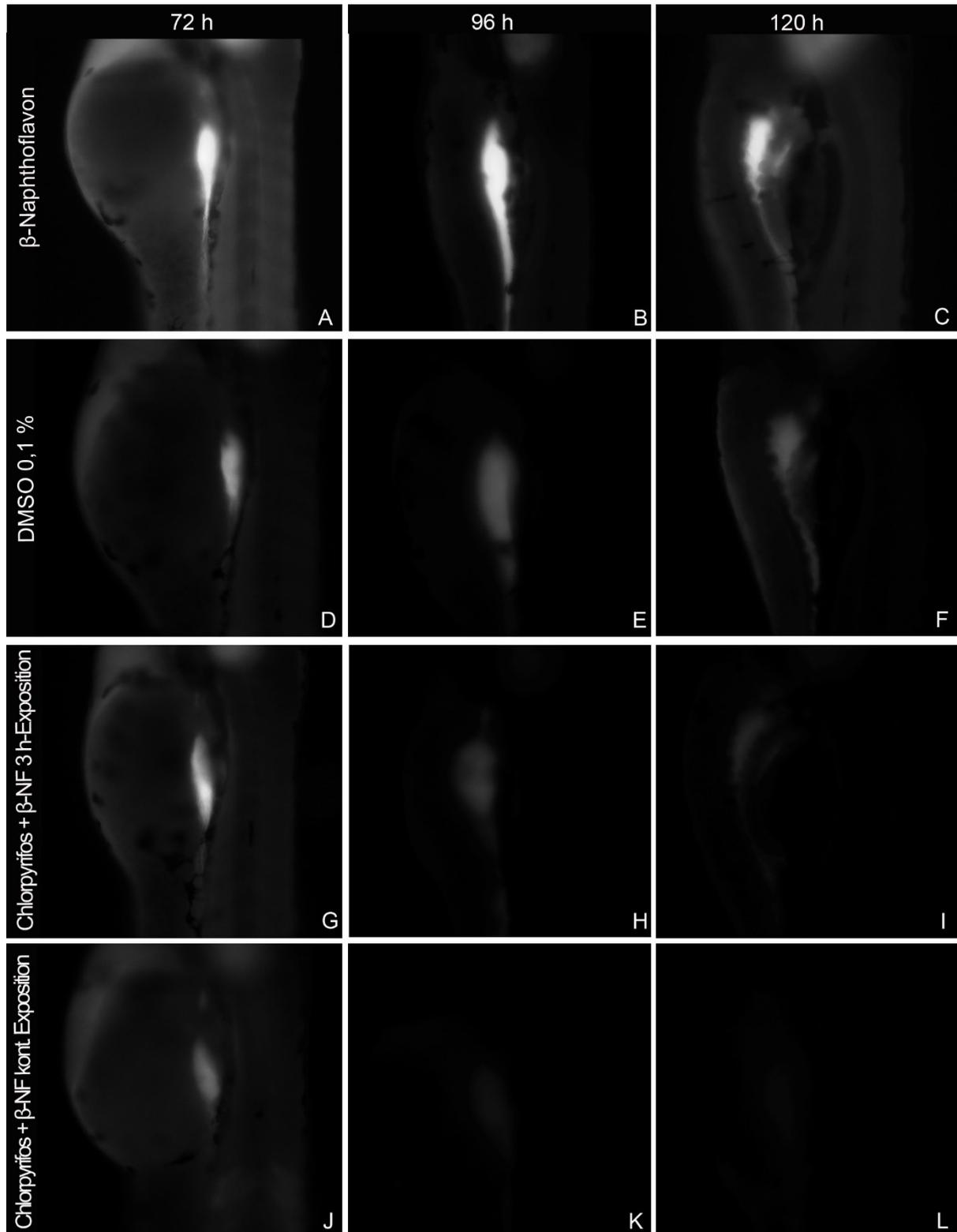


Abb. 33: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten im Embryo des Zebraärlings (*Danio rerio*) nach einer 3 h-Exposition von 72 (A, D, G, J), 96 (B, E, H, K) und 120 h (C, F, I, L) alten Embryonen gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C) Lösungsmittel DMSO 0,1 % (D-F), Chlorpyrifos + 10 µg/L β-Naphthoflavon (G-I) und nach einer kontinuierlichen Exposition von Chlorpyrifos + 10 µg/L β-Naphthoflavon (J-L). In allen Entwicklungsstadien zeigen die Embryonen mit der Kurzzeit-Exposition gegenüber β-Naphthoflavon (A-C), DMSO 0,1 % (D-F), Chlorpyrifos + β-Naphthoflavon (G-I) keine Unterschiede im Induktionsmuster zur kontinuierlichen Exposition (J-L). Eine Ausnahme bildet die Kurzzeit-Exposition von 72 h alten Embryonen (G), die eine stärkere Fluoreszenz zeigen als nach einer kontinuierlichen Exposition (J). Belichtungszeiten: 60 ms (72 h), 30 ms (96 h), 40 ms (120 h).

### 3.2.5 Bisphenol A im EROD-Assay

Der Text des folgenden Abschnitts 3.23.2.5 basiert auf den Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox, 2013 (BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)*“, 318 S und wurde im Original von mir geschrieben.

Bisphenol A wurde in Konzentrationen von 2 – 6 mg/L als Monosubstanz, aber auch in Kombination mit  $\beta$ -Naphthoflavin (10  $\mu$ g/L) getestet. Bisphenol A induzierte in keinem Entwicklungsstadium sowie in keiner Konzentration eine erhöhte EROD-Aktivität und ist ebenso auch kein Inhibitor (Abb. 34).

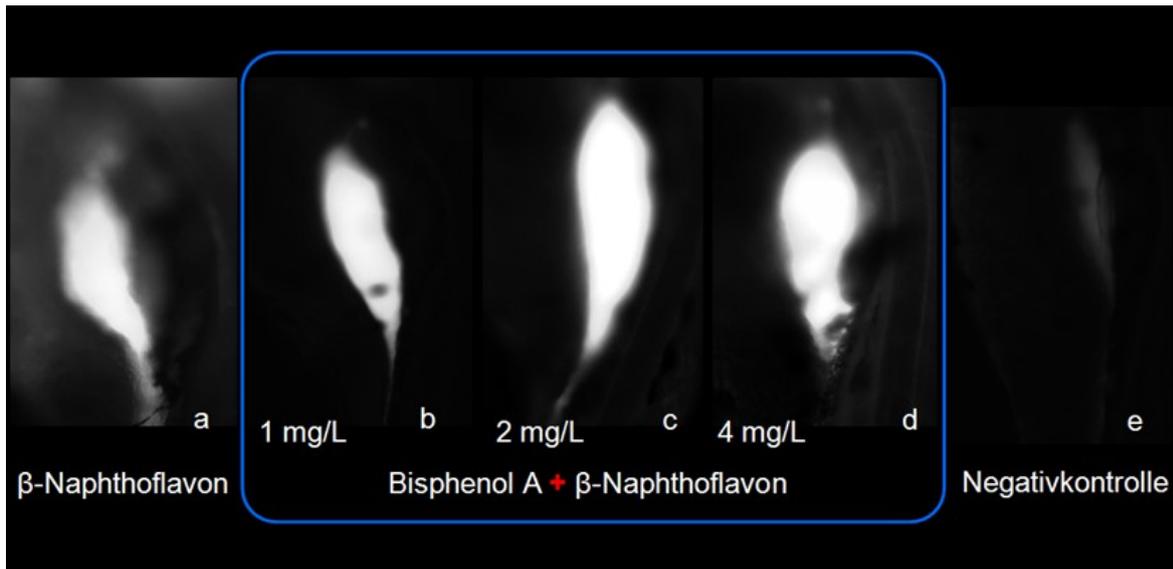


Abb. 34: Embryonen des Zebrafisch (*Danio rerio*) nach 96 h Exposition gegenüber einer Kombination aus  $\beta$ -Naphthoflavin (10  $\mu$ g/L) + 1 (b), 2 (c) und 4 mg/L (d) Bisphenol A. Ein Vergleich mit  $\beta$ -Naphthoflavin (10  $\mu$ g/L) (a) zeigt mit steigender Konzentration keine Abschwächung des EROD-Signals. Die Negativkontrolle (e) zeigt die Grundinduktion eines nicht exponierten Embryos. Alle Aufnahmen wurden mit einer Belichtungszeit von 150 ms aufgenommen.

### 3.2.6 Aroclor 1254 im EROD-Assay

Der Text des Abschnitts 3.23.2.6 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (*Danio rerio*) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*“ Sci Total Environ; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Aroclor 1254 als typischer PCB-Vertreter zeigte nach einer kontinuierlichen Exposition bis 120 h mit 3 mg/L Aroclor 1254 überraschenderweise keine deutliche CYP1A Induktion. Im Vergleich zu dem hohen Induktionspotential von  $\beta$ -Naphthoflavin (Abb. 35 A-C) und dem schwachen Signal der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 35 D-F) unterschied sich die isolierte Exposition gegenüber Aroclor 1254 (Abb. 35 G-I) nicht wesentlich von der Lösungsmittelkontrolle. Eine Koexposition mit Aroclor 1254 + 10  $\mu$ g/L  $\beta$ -Naphthoflavin führte nach 72 h Exposition zu einer gleich starken Signalintensität (Abb. 35 J-L) wie nach der isolierten Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavin (Abb. 35 A-C). Im Gegensatz dazu führte die Koexposition nach 96 und 120 h (Abb. 35 K-L) zu schwächeren Induktionssignalen als bei der isolierten Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavin, jedoch war sie nie geringer als nach der Exposition gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

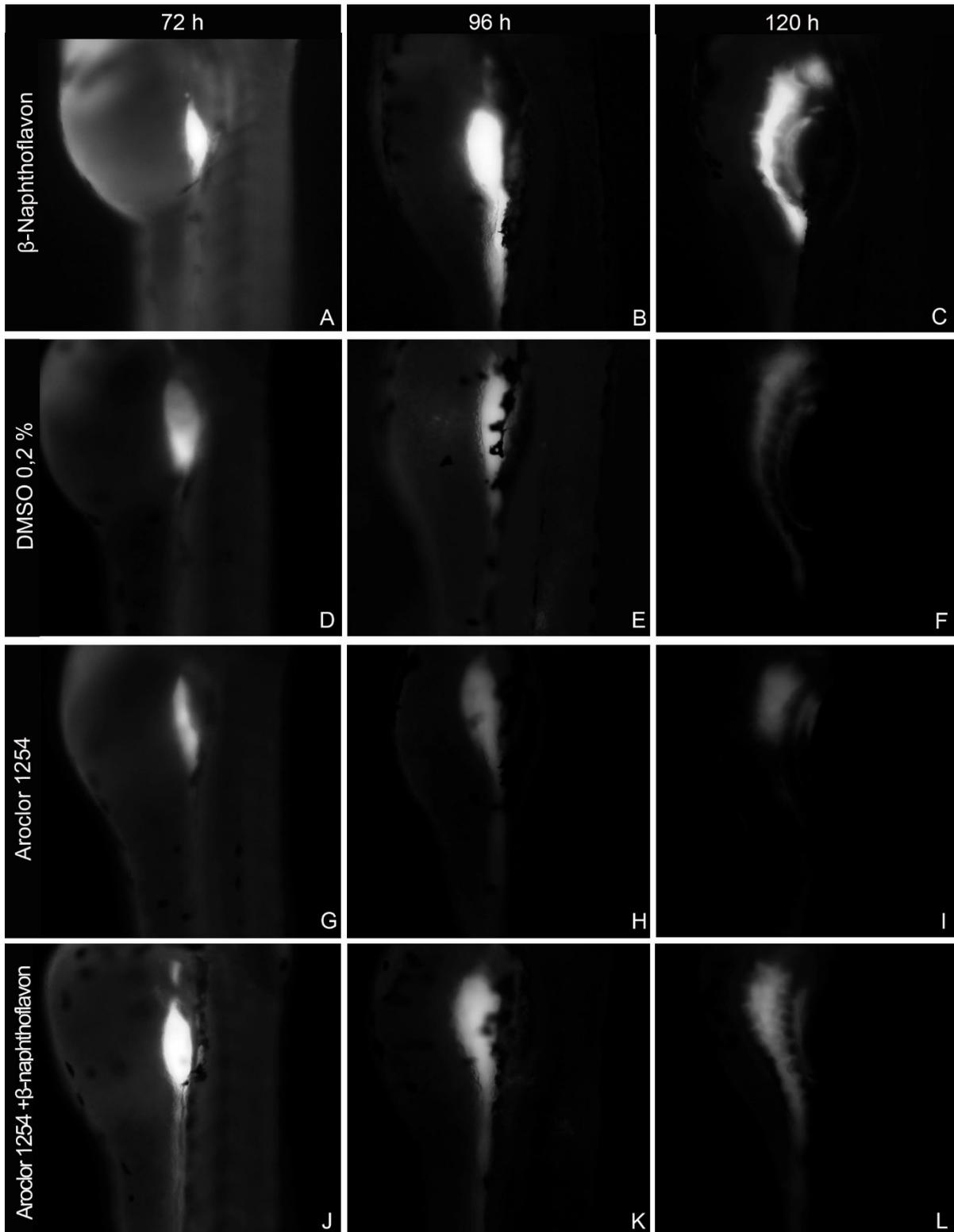


Abb. 35: *In vivo* Lokalisierung der EROD-Induktionsmuster im Embryo des Zebraabrlings (*Danio rerio*) nach 72 (A, D, G, J), 96 (B, E, H, K) und 120 h (C, F, I, L) Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C), Lösungsmittel DMSO 0,2 % (D-F), 3 mg/L Aroclor 1254 (G-I) und 3 mg/L Aroclor1254 + β-NF (J-L). In allen Entwicklungsstadien zeigen Embryonen nach einer β-Naphthoflavon-Exposition ein helles Signal in der Leber (A-C), während Embryonen der Lösungsmittelkontrolle ein schwächeres Signal in der Leber zeigen (D-F). Die Signalintensitäten von Aroclor 1254 als Monosubstanz unterscheiden sich kaum von der Lösungsmittelkontrolle (G-I). Die Koexposition gegenüber Aroclor 1254 + β-NF zeigt nach 72 h ein gleich starkes Signal wie nach einer β-NF-Exposition (J), während das Signal nach 96 h und 120 h dem der Lösungsmittelkontrolle gleicht (K-L). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

### Aroclor 1254 in verschiedenen Konzentrationen

Um eine mögliche hemmende Wirkung von Aroclor 1254 auf das CYP1A genauer zu untersuchen, wurden Embryonen mit 0,5, (Abb. 37 G-I) 1 (Abb. 37 J-L) und 3 mg/L Aroclor 1254 (Abb. 37 M-O) in Kombination mit 10 µg/L β-Naphthoflavin exponiert. Das starke Signal der β-Naphthoflavin-Exposition (Abb. 37 A-C) und das schwächere Signal der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 37 D-F) bestätigen die Korrektheit des Testsystems.

Während Aroclor 1254 bei der niedrigsten Konzentration von 0,5 mg/L (Abb. 37 G-I) die Signalintensität von β-Naphthoflavin nicht verringerte, zeigte sich bei den höheren Konzentrationen von 1 und 3 mg/L nach 96 und 120 h eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der der β-Naphthoflavin-Exposition als Monosubstanz (Abb. 37 K-L, N-O). Auch bei diesem Versuch bildete das Entwicklungsstadium der 72 h alten Embryonen eine Ausnahme, bei ihnen verringerte sich das Fluoreszenzsignal bei keiner Konzentration.

Die densitometrische Quantifizierung der Fluoreszenz nach der β-Naphthoflavin-Exposition ergab gemittelte Grauwerte zwischen 45.000 nach 72 h und 20.000 Einheiten nach 96 und 120 h. Angesichts der Notwendigkeit einer höheren DMSO-Konzentration von 0,2 % zeigten alle Embryonen der Lösungsmittelkontrolle einen signifikanten Unterschied zu β-Naphthoflavin als Monosubstanz mit gemittelten Grauwerten von ≤ 10.000 Einheiten. Nur lang andauernde Koexpositionen von > 96 und 120 h zeigten bei den höheren Konzentrationen von 1 und 3 mg/L Aroclor 1254 + β-NF einen signifikanten Unterschied zur maximalen Induktion von β-Naphthoflavin (Levene-Test:  $\alpha < 0,05$ ; Abb. 36).

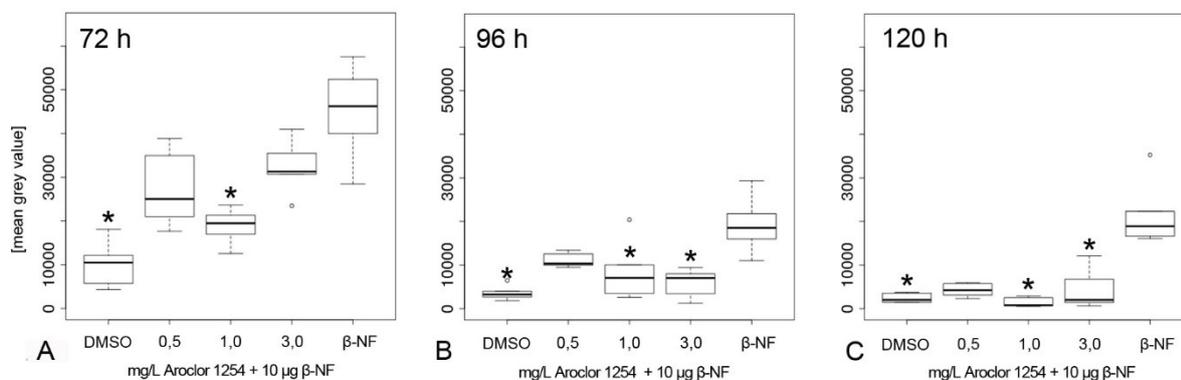


Abb. 36: Das EROD-Induktionspotential in 72 (A), 96 (B) und 120 h (C) alten Embryonen des Zebrafischlings (*Danio rerio*), grafisch dargestellt als mittlere Intensität der Fluoreszenz (n=4-6), die über Grauwert-Bestimmung mithilfe der Software NIS-Elements 4.0 ermittelt worden ist. Die Embryonen wurden kontinuierlich gegenüber DMSO 0,2 %, 0,5, 1,0 und 3,0 mg/L Aroclor 1254 + β-NF und β-Naphthoflavin als Monosubstanz exponiert. Die EROD-Aktivitäten werden als Box-Plots für drei unabhängige Läufe (n=3) pro Konzentration angegeben, die jeweils von 4-6 Embryonen stammen. Die Boxplots zeigen die Mediane, 25 % und 75 % Perzentile (obere und untere Grenze des Balkens) und Ausreißer > 5 % und 95 % Perzentile (°) an. (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zu β-Naphthoflavin (Levene-Test:  $\alpha < 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied in der EROD-Aktivität gegenüber β-Naphthoflavin zeigt sich nur in den höheren Konzentrationen von 1 und 3 mg/L Aroclor 1254 + β-NF und in den späteren Entwicklungsstadien (≥ 96 h).

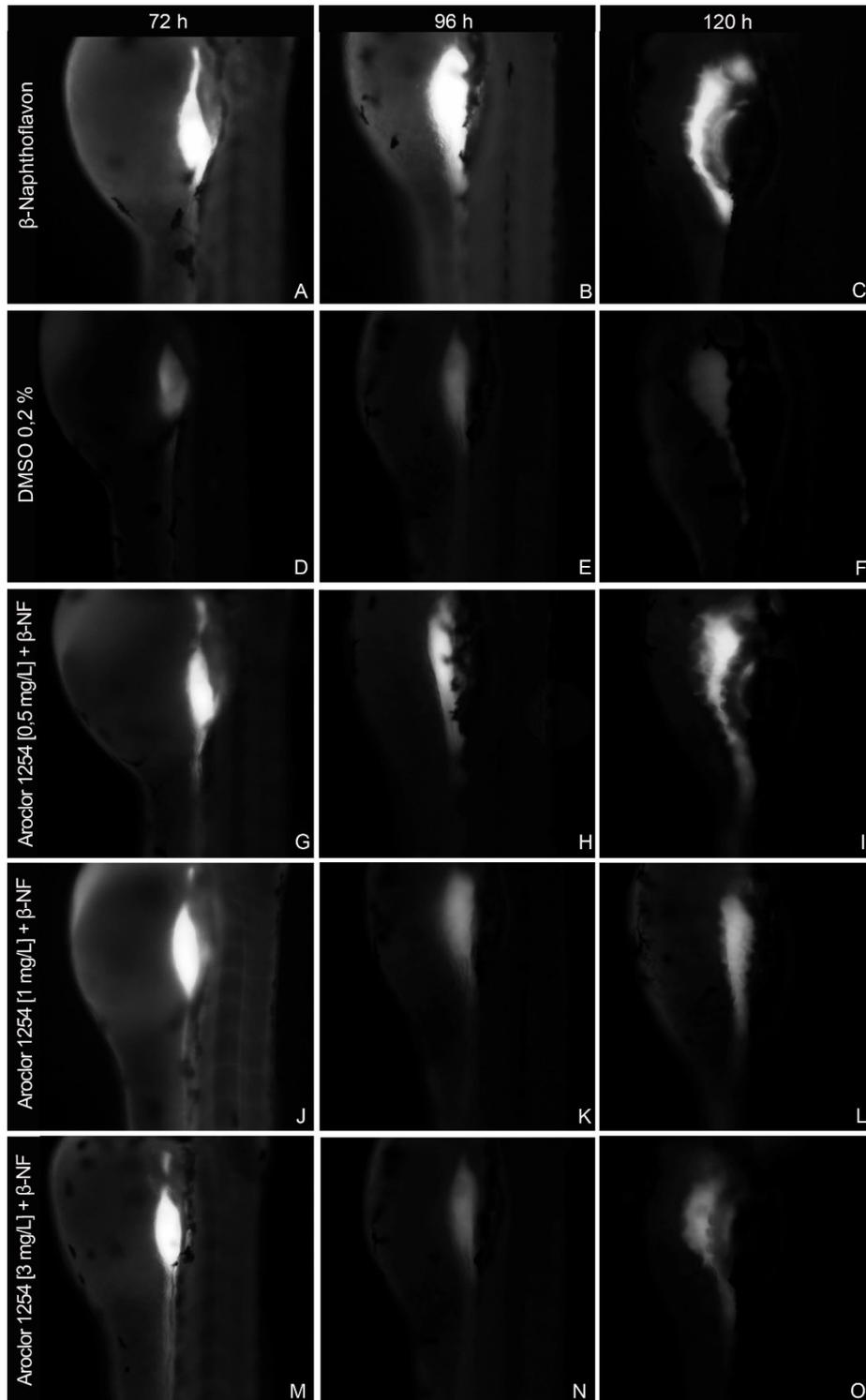


Abb. 37: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten im Embryo des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach 72 (A, D, G, J, M), 96 (B, E, H, K, N) und 120 h (C, F, I, L, O) Exposition gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C) Lösungsmittel DMSO 0,2 % (D-F), 0,5 (G-I), 1,0 (J-L) und 3,0 mg/L Aroclor 1254 (M-O) + jeweils 10 µg/L β-Naphthoflavon. In allen Entwicklungsstadien zeigen Embryonen nach einer β-Naphthoflavon-Exposition ein helles (A-C) bzw. in der Lösungsmittelkontrolle ein schwächeres EROD- Signal in der Leber (D-F). Die 72 h alten Embryonen zeigen bei allen Konzentrationen keine Abnahme der EROD-Aktivität (G, J, M). Die Signalintensitäten nach 96 und 120 h Exposition gegenüber 1 und 3 mg/L Aroclor 1254 zeigen hingegen eine deutliche Abnahme der Signalintensität, wobei diese nicht geringer als bei der Lösungsmittelkontrolle ausfällt (K-L und N-O). Bei der niedrigsten Konzentration von 0,5 mg/L Aroclor 1254 + β-NF kommt es in keinem Entwicklungsstadium zu einer Hemmung der EROD-Aktivität (G-I). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeiten: 40 ms.

### Live-Imaging-EROD-Assay nach einer 3 h Kurzzeit- Exposition mit Aroclor 1254 + $\beta$ -Naphthoflavon

Um herauszufinden, ob die Abnahme der Signalintensität nach längerer Exposition gegenüber höheren Konzentrationen von Aroclor 1254 auf zeitabhängige Akkumulation zurückzuführen war, wurde die Expositionsdauer gegenüber der Kombination von Aroclor 1254 +  $\beta$ -NF auf 3 h begrenzt. Wie bereits in Abschnitt 3.23.2.4 beschrieben, waren die EROD-Aktivitäten nach kurzzeitiger und kontinuierlicher Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon sowie gegenüber der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar. Während hingegen die kontinuierliche Exposition gegenüber 3 mg/L Aroclor 1254 eine zeitabhängige Verringerung der Signalintensität zeigte (Abb. 39 G-I), war bei der 3 h-Kurzzeit-Exposition selbst in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien keine Abnahme der Signalstärke in 96 und 120 h alten Embryonen zu beobachten (Abb. 39 J-L).

Die densitometrische Quantifizierung der Fluoreszenz nach einer drei stündigen  $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition in 72, 96 und 120 h ergab hohe mittlere Grauwerte von ca. 45.000, 58.000 und 40.000 Einheiten (Abb. 38). Nur bei 72 h alten Embryonen ergab die Exposition gegenüber DMSO 0,2 % einen signifikanten Unterschied zur maximalen Induktion von  $\beta$ -Naphthoflavon (Levene-Test:  $\alpha < 0,05$ ; Abb. 38 A). Im Gegensatz dazu zeigte die Kurzzeit-Exposition gegenüber Aroclor 1254 +  $\beta$ -NF in keinem Entwicklungsstadium und bei keiner Konzentration einen signifikanten Unterschied zu  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz (Abb. 38 A-C).

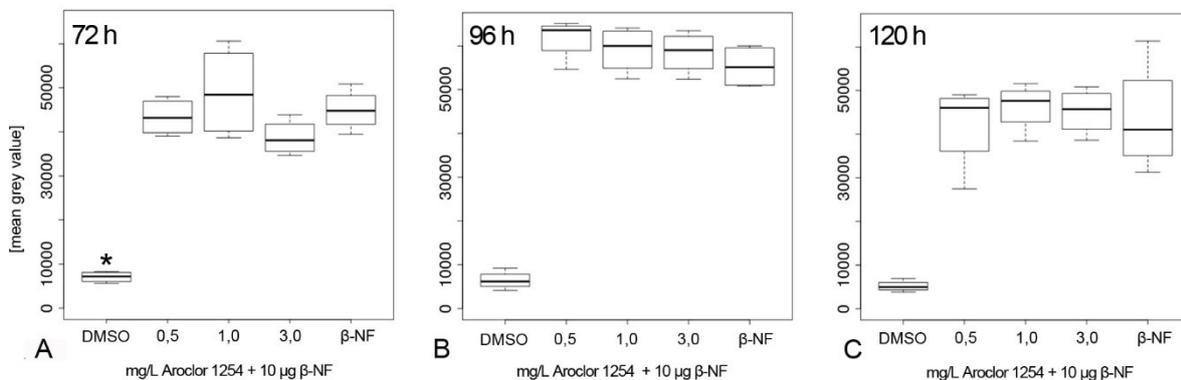


Abb. 38: Das EROD-Induktionspotential in 72 (A), 96 (B) und 120 h (C) alten Embryonen des Zebrafärblings (*Danio rerio*), grafisch dargestellt als mittlere Intensität der Fluoreszenz (n=4-6), die über Grauwert-Bestimmung mithilfe der Software NIS-Elements 4.0 ermittelt worden ist. Die Embryonen wurden **über 3 h** gegenüber DMSO 0,2 %, 0,5, 1,0 und 3,0 mg/L Aroclor 1254 +  $\beta$ -NF und  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz exponiert. Die EROD-Aktivitäten werden als Box-Plots für drei unabhängige Läufe (n=3) pro Konzentration angegeben, die jeweils von 4-6 Embryonen stammen. Die Boxplots zeigen die Mediane, 25 % und 75 % Perzentile (obere und untere Grenze des Balkens) und Ausreißer > 5 % und 95 % Perzentile (°) an. (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zu  $\beta$ -Naphthoflavon (Leven-Test:  $\alpha < 0,05$ ). Nach einer Kurzzeit-Exposition zeigt sich in keinem Entwicklungsstadium und bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zu  $\beta$ -Naphthoflavon als Monosubstanz.

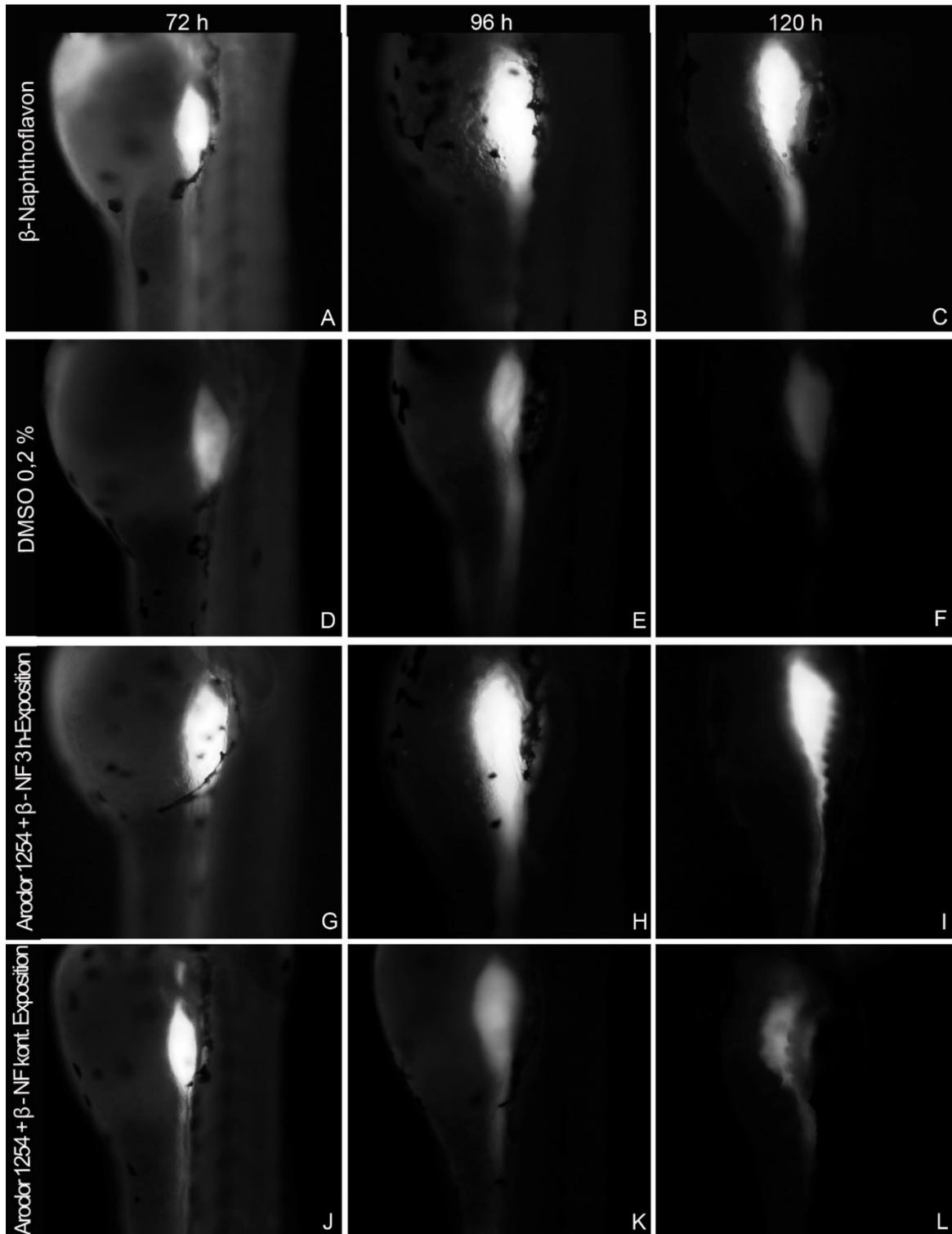


Abb. 39: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten im Embryo des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach einer 3 h-Exposition von 72 (A, D, G, J), 96 (B, E, H, K) und 120 h (C, F, I, L) alten Embryonen gegenüber 10 µg/L β-Naphthoflavon (A-C) Lösungsmittel DMSO 0,2 % (D-F), Aroclor 1254 + 10 µg/L β-NF 3 h-Exposition (G-I) und nach einer kontinuierlichen Exposition von Aroclor 1254 + 10 µg/L β-NF (J-L). In allen Entwicklungsstadien zeigen die Embryonen mit der Kurzzeit-Exposition gegenüber β-Naphthoflavon (A-C) sowie DMSO 0,2 % (D-F) keine Unterschiede im Induktionsmuster zur kontinuierlichen Exposition (J-L). EROD-Aktivitäten nach einer Kurzzeit-Exposition gegenüber Aroclor 1254 sind deutlich höher als nach einer kontinuierlichen Exposition und vergleichbar mit den Signalen nach einer β-Naphthoflavon-Exposition (H-I). Die kontinuierliche Exposition gegenüber Aroclor 1254 hingegen führt zu einer zeitabhängigen Abnahme der Signalintensität, mit einem starken Signal nach 72 h (J) und einem niedrigeren nach 96 (K) und 120 h (L). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

### 3.2.7 Chinolin

Chinolin zeigte in keinem Entwicklungsstadium und bei keiner der ausgesuchten Konzentrationen (7,5, 12,5 und 20 mg/L) eine Induktion oder Hemmung der EROD-Aktivität.

### 3.2.8 2,3-Benzofuran

2,3-Benzofuran wurde in Konzentrationen von 8,5, 19 und 26 mg/L sowohl als Monosubstanz als auch in Kombination mit  $\beta$ -Naphthoflavin (10  $\mu$ g/L) in einer 3 h- und Dauerexposition, bei 72, 96 und 120 h alten Embryonen, auf EROD-Aktivität getestet. Es wurde bei keiner Konzentration und in keinem Entwicklungsstadium eine EROD-Aktivität im Embryo nach einer Belastung mit 2,3-Benzofuran nachgewiesen.

### 3.2.9 Sedimente

Der Text des Abschnitts 3.03.2.9 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo EROD assays with the zebrafish (Danio rerio) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity*” *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Alle Sedimentextrakte (Veringkanal, Altrip und Ehrenbreitstein) zeigten eine starke EROD-Induktion. Die besten Induktionen wurden jeweils mit den niedrigsten Konzentrationen erzielt, die auch deutlich unter den EC<sub>10</sub>-Werten lagen. Die Sedimente aus Altrip und Ehrenbreitstein zeigten bei Konzentrationen von 1,56 mg/SEQ/ml und die Sedimente aus dem Veringkanal bereits bei 31,5  $\mu$ g SEQ/ml eine starke Induktion der EROD-Aktivität. Auch bei den Sedimentextrakten zeigte sich, dass eine Kurzzeit-Exposition von 3 h, zu höheren Signalintensitäten und zu Fluoreszenzbereichen mit präziseren Konturen führten (Abb. 40 A-C) als im Vergleich zu einer kontinuierlichen Exposition (Abb. 40 D-F). Im Gegensatz dazu, erschienen die Fluoreszenz-Bereiche der kontinuierlichen Exposition verschwommen, die Konturen waren nicht klar nachweisbar (Abb. 40 D-F). Hinzu kam, dass das Hintergrundsignal des gesamten Tieres deutlich erhöht war (insbesondere Abb. 40 E) und lässt auf eventuelle Diffusionsprozesse deuten. Die Unterschiede in den Signalintensitäten zeigte sich besonders bei den toxischsten Sedimentextrakten aus dem Veringkanal (Abb. 40 C, F).

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu verdeutlichen, wurden die Embryonen 31,5, 50 und 125  $\mu$ g SEQ/ml Sedimentextrakt aus dem Veringkanal (äquivalent zu EC<sub>10</sub>-, EC<sub>35</sub>- und LC<sub>5</sub>-Werten) für 3 h (Abb. 41 A-C) und kontinuierlich (Abb. 41 D-F) exponiert. Abb. 41 veranschaulicht, dass die EROD-Aktivität in einer selektiven zeit- und dosisabhängigen Weise abnahm, die eine eventuelle Interferenz entweder mit akuten toxischen Prozessen und/oder der Anwesenheit von inhibierenden Substanzen in dem Extrakt anzeigt. Diese Tendenz zeigt sich bereits nach der Kurzzeit-Exposition gegenüber der höchsten Konzentration (Abb. 41 C), jedoch ist der Rückgang des Signals nach einer kontinuierlichen Exposition noch ausgeprägter (Abb. 41 F).

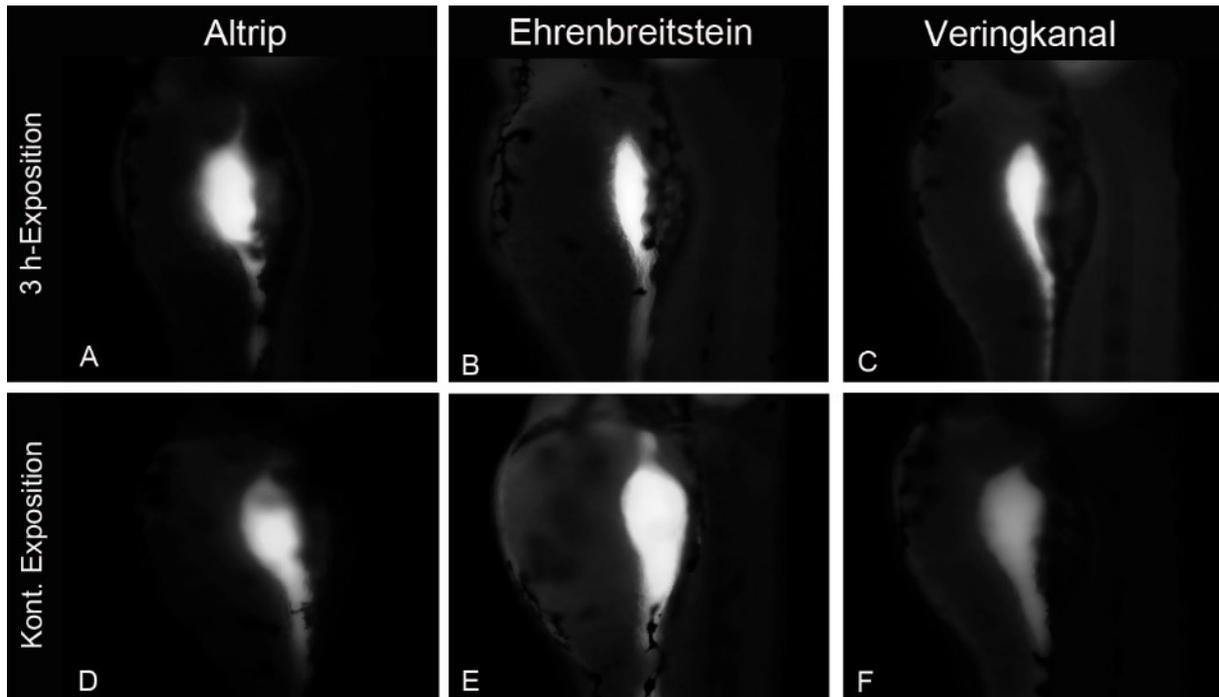


Abb. 40: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten in 96 h alten Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach einer 3 h-Exposition (A-C) und einer kontinuierlichen Exposition (D-F) gegenüber 1,56 mg SEQ/ml Sedimentextrakt aus Altrip (A, D) und Ehrenbreitstein (B, E) sowie 31,5 µg SEQ/ml Sedimentextrakt aus dem Veringkanal (C, F). Alle drei Sedimentextrakte zeigen eine deutliche Induktion der EROD-Aktivität. Tendenziell führt die Kurzzeit-Exposition zu höheren Signalintensitäten, jedoch zu kleineren Flächen mit präziseren Konturen (besonders bei C, F). Anzahl der Experimente  $n = 2$  für Altrip und Ehrenbreitstein;  $n = 5$  für Veringkanal (jeweils 4-6 Embryonen). Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

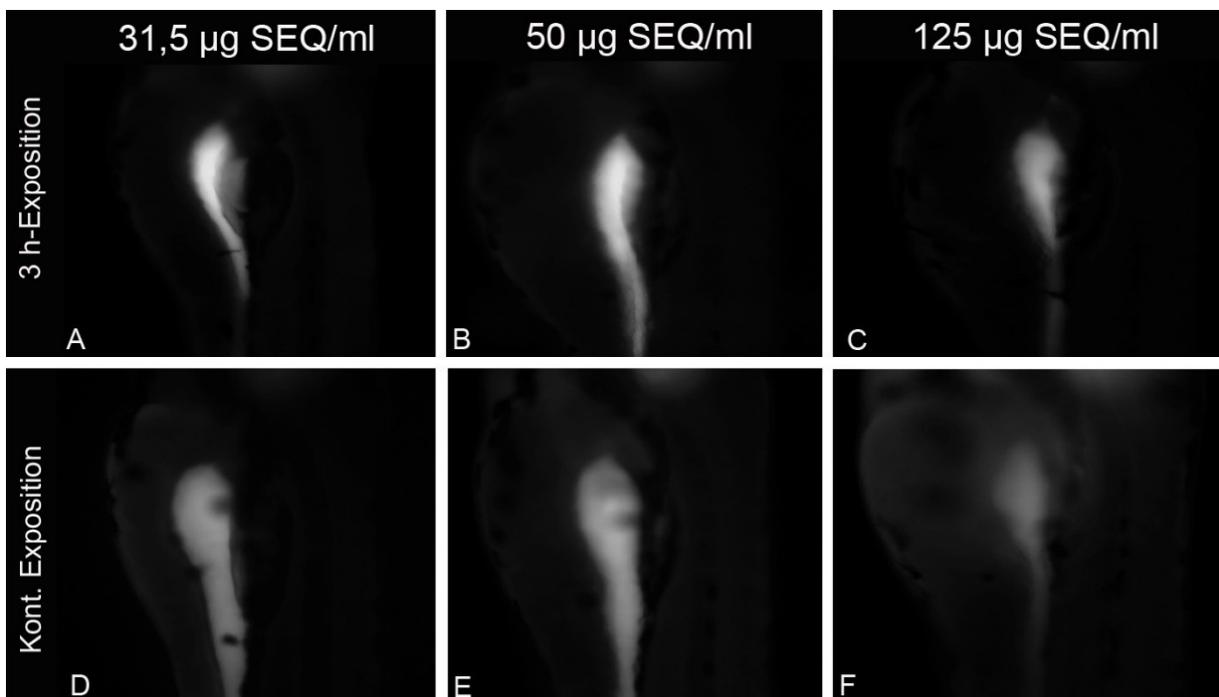


Abb. 41: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten in 96 h alten Embryonen des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) nach einer 3 h-Exposition (A-C) und einer kontinuierlichen Exposition (D-F) gegenüber 31,5 (A, D), 50 (B, E) und 125 µg (C, F) SEQ/ml Sedimentextrakt aus dem Veringkanal. Bei der höchsten Konzentration des Sedimentextraktes (C, F) nahm die Signalintensität insbesondere nach kontinuierlicher Exposition (D-F) ab. Anzahl der Experimente  $n = 3$  mit jeweils 4-6 Embryonen. Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 30 ms.

Zur weiteren Charakterisierung der Unterschiede zwischen einer kurzzeitigen 3 h und einer kontinuierlichen Exposition wurden Embryonen (sehr) hohen Konzentrationen von 100 und 360 µg SEQ/ml (entspricht den LC<sub>4</sub>- und LC<sub>10</sub>-Werten) Sedimentextrakten des Veringkanals ausgesetzt. Das Fluoreszenzsignal nach einer 3 h Exposition mit der höchsten Konzentration zeigte in 96 h alten Embryonen ein abgeschwächtes und diffuses Signal, wie es zuvor für die kontinuierliche Exposition beschrieben worden ist (Abb. 42 A). Hingegen war nach einer kontinuierlichen Exposition mit der höchsten Konzentration nach 96 h kaum ein Fluoreszenzsignal im Lebergewebe nachweisbar. Stattdessen war eine diffuse Fluoreszenz über den gesamten Körper zu beobachten, bzw. das Hintergrundsignal war sehr hoch (Abb. 42 B). Ein besonders starkes Fluoreszenzsignal zeigte sich im Herzen und in dem Ductus Cuvieri, der gemeinsamen Kardinalvene, die das gesammelte venöse Blut zum Herzen bringt (Abb. 42 B). Die beschriebene diffuse Fluoreszenz könnte somit als Anzeichen für allgemeinen Stress, aber auch als eine pathologische Veränderung des Gewebes aufgrund der hohen Konzentrationen von Xenobiotika gedeutet werden.

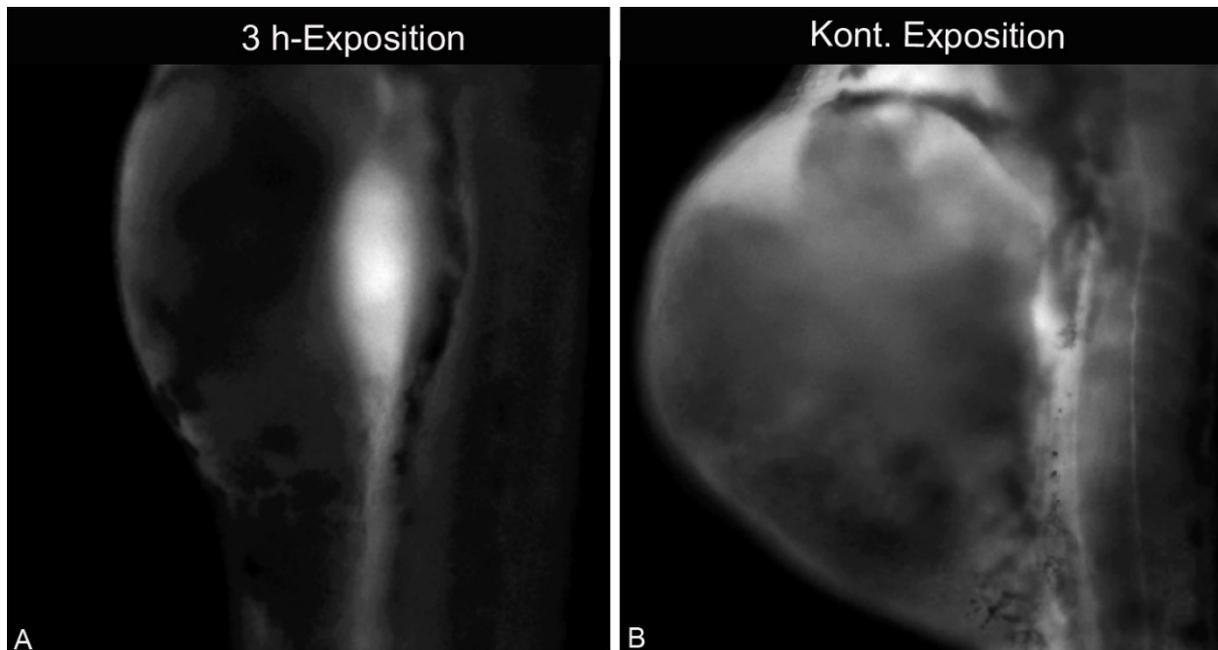


Abb. 42: *In vivo*-Lokalisierung der EROD-Aktivitäten in 96 h alten Embryonen des Zebrafährblings (*Danio rerio*) nach einer 3 h-Exposition (A) und einer kontinuierlichen Exposition (B) gegenüber 360 µg SEQ/ml Sedimentextrakt aus dem Veringkanal. Während nach einer 3 h-Exposition eine EROD-Aktivität noch nachweisbar ist (A), ist diese nach einer kontinuierlichen Exposition kaum noch zu detektieren (B). Anzahl der Experimente n = 1 mit 4-6 Embryonen. Epifluoreszenzmikroskopie, Belichtungszeit: 40 ms.

### 3.3 Acetylcholinesterase-Assay (AChE-Assay)

Der Text des folgenden Abschnitts 3.3 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2015, „Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments” Environ Sci Pollut Res Int 2015; 22: 16329-16339 und wurde in Zusammenarbeit mit Stengel, D. im Original zu gleichen Anteilen gemeinsam geschrieben und von mir übersetzt.

#### 3.3.1 Acetylcholinesterase-Assay mit Paraoxon-methyl

Paraoxon-methyl soll für den Acetylcholinesterase -Assay als Positivkontrolle etabliert werden. Hierzu wurden zunächst Fischembryotests durchgeführt um eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die akute Toxizität von Paraoxon-methyl zu erstellen (Abb. 43, rechte Achse). Die hauptsächlich subletalen Effekte waren bei allen Konzentrationen unspezifische Krämpfe, die in einer dosisabhängigen Weise verstärkt wurden und bis hin zu einer Paralyse führten. Der ermittelte EC<sub>10</sub> für Paraoxon-methyl lag bei 2 mg/L.

Um zu überprüfen, ob die Acetylcholinesterase spezifisch in 96 h alten Embryonen gemessen werden kann, wie von Bertrand et al. (2001) und Behra et al. (2004) postuliert, und ob Paraoxon-methyl in einer Konzentration von 2 mg/L eine Inhibierung der Acetylcholinesterase-Aktivität erreichen kann, wurde das Testsystem mit Paraoxon-methyl evaluiert und etabliert. Letztendlich zeigte 2 mg/L Paraoxon-methyl eine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität von ca. 70 % der Negativkontrolle (Abb. 43, li Achse).

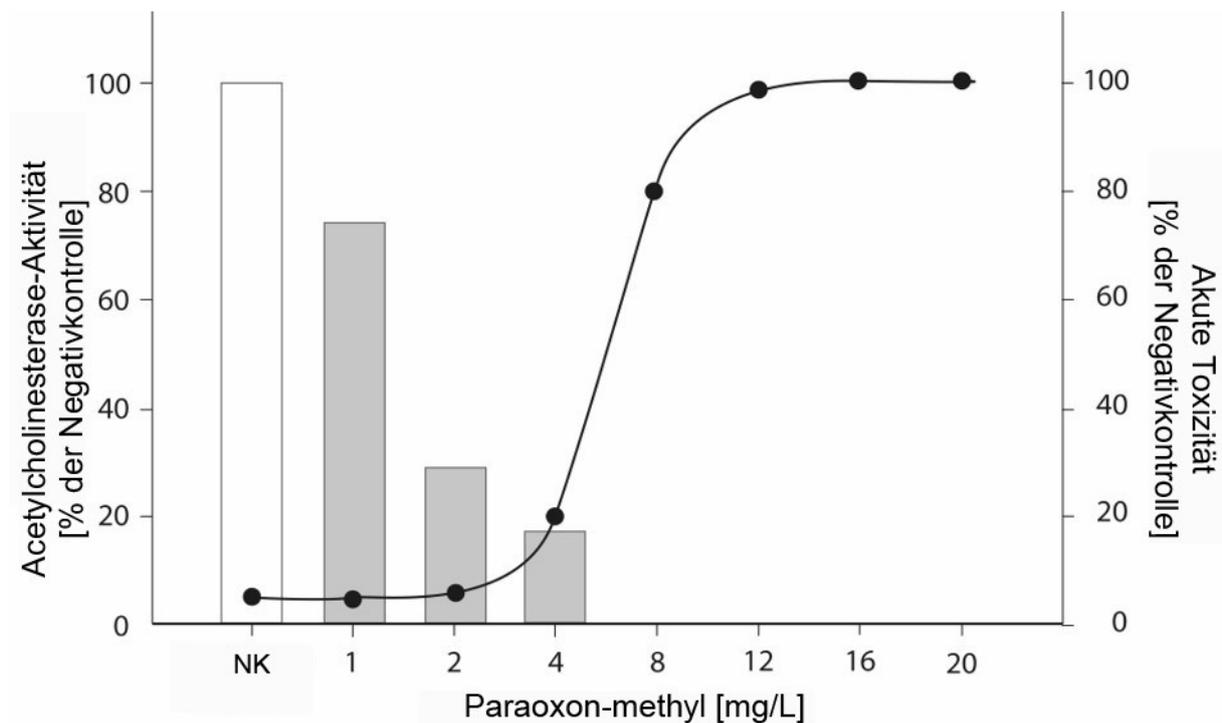


Abb. 43: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten (**linke Achse**) sowie kombinierte letale und subletale Effekte im FET nach einer 96 h-Exposition mit Paraoxon-methyl (**rechte Achse**). Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (100 %, linke Achse, weißer Balken) ausgedrückt. Die kombinierten letalen und subletalen Effekte werden als Prozent der verwendeten Embryonen exemplarisch dargestellt (n=20, rechte Achse).

### 3.3.2 Acetylcholinesterase-Hemmung durch ausgewählte Monosubstanzen

Da interessanterweise Chlorpyrifos, Aroclor 1254 und Methylquecksilberchlorid ähnliche subletale Effekte, wie die oben beschriebenen Krämpfe zeigten, wurden Embryonen mit EC<sub>10</sub>-Konzentrationen der sechs ausgewählten Monosubstanzen: Chlorpyrifos, 2,3-Benzofuran, Chinolin, Bisphenol A, Methylquecksilberchlorid und Aroclor 1254 exponiert, um eine mögliche AChE-Hemmung mit dem AChE-Assay zu überprüfen.

Chlorpyrifos führte zu einer signifikanten Verringerung der Acetylcholinesterase-Aktivität bei Konzentrationen, die weit unter dem EC<sub>10</sub>-Wert von 0,62 mg/L lagen (Abb. 44). Die Acetylcholinesterase-Aktivität nach einer Chlorpyrifos-Exposition betrug nur noch 30 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle und zeigte somit eine Reduktion von ca. 70 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle.

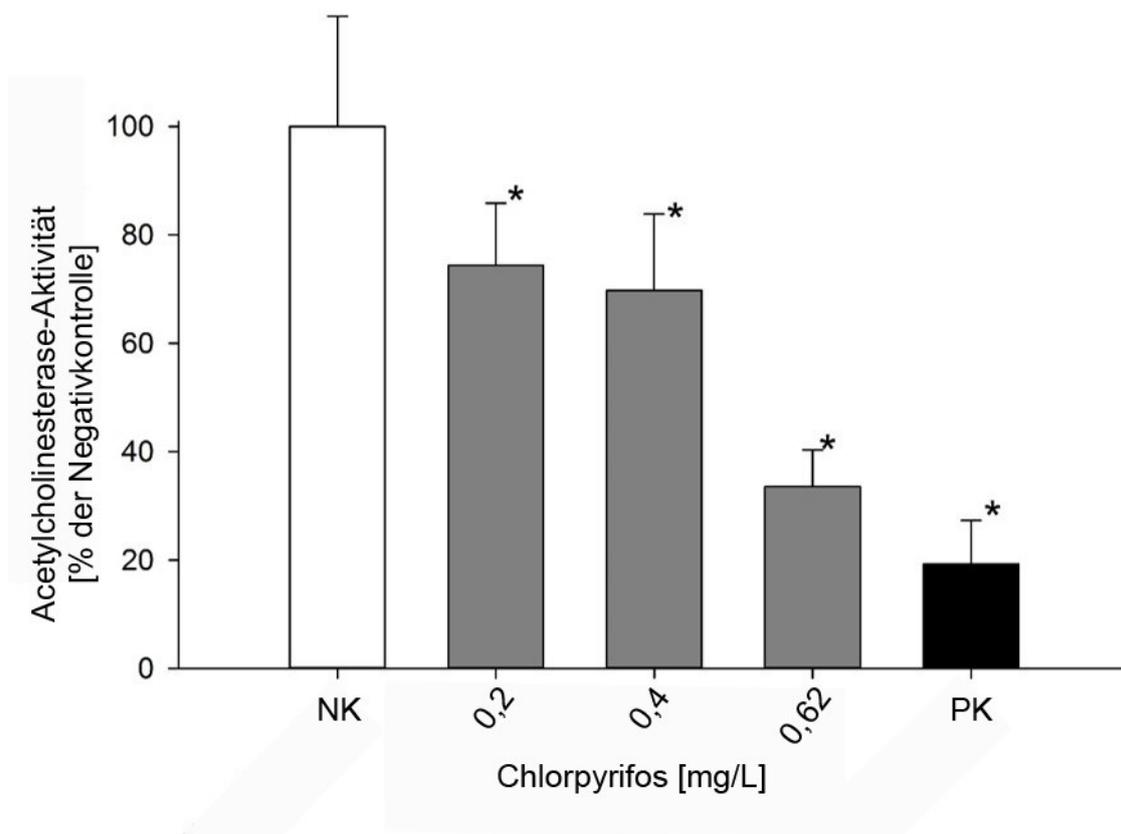


Abb. 44: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten in Pools von fünf 96 h alten Embryonen des Zebrafischlings nach einer 96 h-Exposition gegenüber 0,2, 0,4 und 0,62 mg/L Chlorpyrifos. Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (NK) ausgedrückt. Paraoxon-methyl (2 mg/L) wird als Positivkontrolle (PK) angegeben, (n=3). (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle  $p < 0,05$  (Einweg-ANOVA, Dunn-Test). Alle Embryonen zeigen nach einer Chlorpyrifos-Exposition einen signifikanten Unterschied in der spezifischen Acetylcholinesterase-Aktivität zur Negativkontrolle und somit eine deutliche Abschwächung der Acetylcholinesterase-Aktivität.

Mit Ausnahme von Chlorpyrifos, verursachte jedoch sonst keine der ausgewählten Monosubstanzen eine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität. Auch die zwei Substanzen Aroclor 1254 und Methylquecksilberchlorid, die die gleichen charakteristischen Krämpfe in den Embryonen auslösten, entwickelten auch in höheren Konzentrationen trotz eines zunehmenden schlechten Allgemeinzustandes (Daten nicht dargestellt), keine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität (Abb. 45). Ebenso zeigte keine der Lösungsmittel DMSO oder NaOH einen Einfluss auf die Acetylcholinesterase-Aktivität (Daten nicht dargestellt).

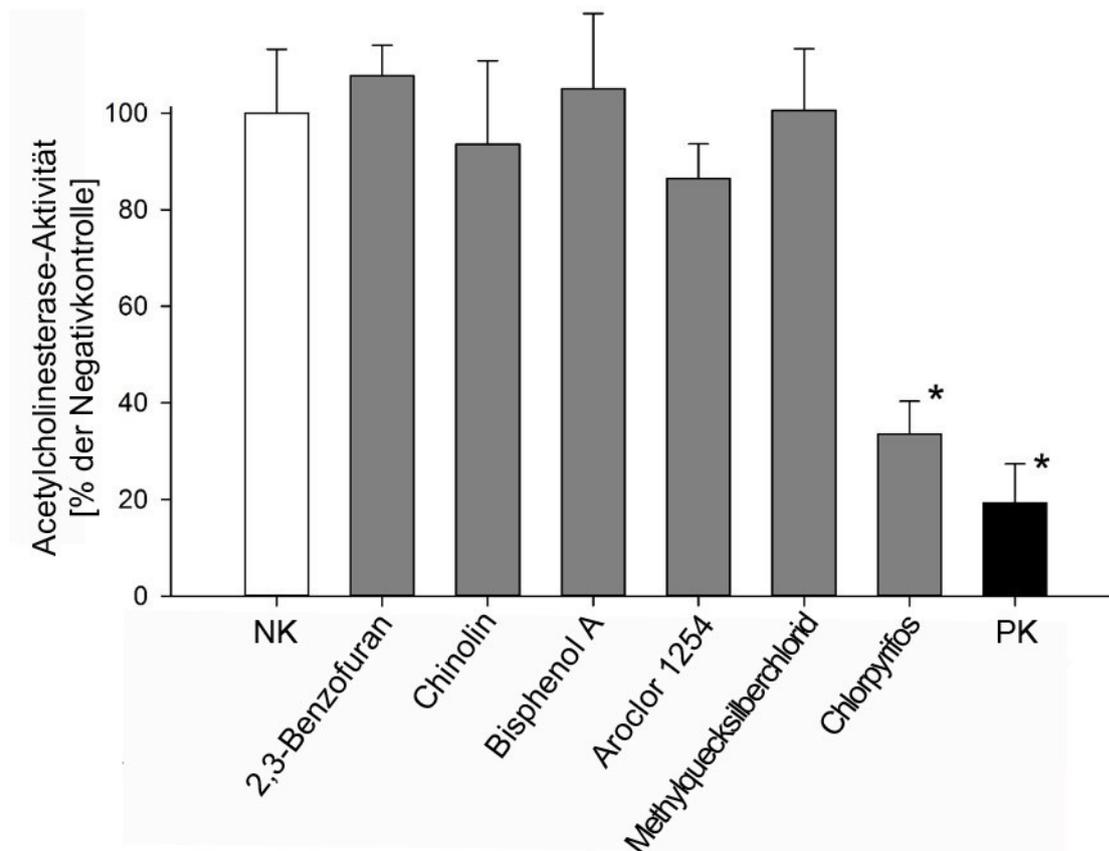


Abb. 45: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten in Pools von fünf 96 h alten Embryonen des Zebraäbrblings nach einer 96 h-Exposition gegenüber: **2,3-Benzofuran** [11 mg/L], **Chinolin** [9 mg/L], **Bisphenol A** [4 mg/L], **Aroclor 1254** [3 mg/L], **Methylquecksilberchlorid** [0,03 mg/L] und **Chlorpyrifos** [0,6 mg/L]. Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (NK) ausgedrückt. Paraoxon-methyl (2 mg/L) wird als Positivkontrolle (PK) angegeben, (n=3). (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle  $p < 0,05$  (Einweg-ANOVA, Dunn-Test). Mit Ausnahme der Embryonen nach der Chlorpyrifos-Exposition, zeigen keine weiteren Embryonen gegenüber den anderen Monosubstanzen einen signifikanten Unterschied in der spezifischen Acetylcholinesterase-Aktivität zur Negativkontrolle.

### 3.3.3 Acetylcholinesterase-Assay mit Sedimentextrakten

Die Embryonen zeigten nach 96 h Exposition gegenüber den Sedimentextrakten Altrip und Ehrenbreitstein sowie den entsprechenden Lösungsmittel- und Prozesskontrollen (Daten nicht dargestellt) keinerlei signifikante Effekte auf die Acetylcholinesterase-Aktivität (Abb. 46).

Das Sedimentextrakt aus dem Veringkanal zeigte hingegen eine deutliche Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität. Diese betrug nach einer Exposition mit dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal noch 62 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle und entspricht einer Reduktion von ca. 32 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle. Das Sedimentextrakt aus dem Veringkanal ist somit ein schwächerer Inhibitor als Chlorpyrifos, stellt aber einen deutlichen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle dar (Abb. 46).

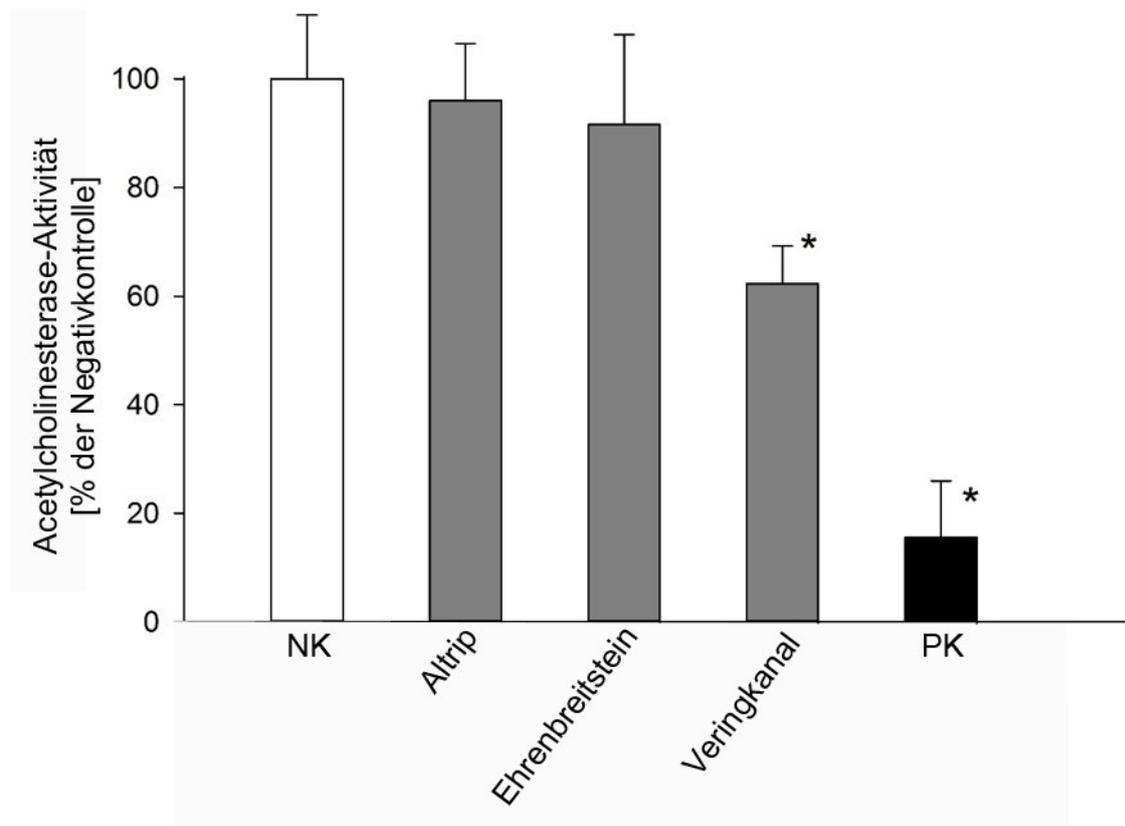


Abb. 46: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten in Pools von fünf 96 h alten Embryonen des Zebraäbrblings nach einer 96 h-Exposition gegenüber den Sedimentextrakten aus: Altrip [5 mg SEQ/ml], Ehrenbreitstein [5 mg SEQ/ml] und Veringkanal [0,033 mg SEQ/ml]. Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (NK) ausgedrückt. Paraoxon-methyl (2 mg/L) wird als Positivkontrolle (PK) angegeben, (n=3). (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle  $p < 0,05$  (Einweg-ANOVA, Dunn-Test). Nur die Embryonen nach der Exposition mit dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal zeigen einen signifikanten Unterschied in der spezifischen Acetylcholinesterase-Aktivität zur Negativkontrolle.

Eine detailliertere Untersuchung verschiedener Konzentrationen des Sedimentextrakts aus dem Veringkanal zeigte eine Dosis- Wirkungs-Beziehung: Je höher die eingesetzte Konzentration, desto höher bildete sich die hemmende Wirkung aus. Alle Konzentrationen  $\geq 20 \mu\text{g SEQ/ml}$  zeigten einen signifikanten Unterschied zur Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle und lagen damit sogar unter dem ermittelten  $EC_{10}$ -Wert (Abb. 46). Insgesamt zeigten sich allerdings in diesem Versuch höhere Acetylcholinesterase-Aktivitäten, die erst bei  $70 \mu\text{g SEQ/ml}$  eine vergleichbare Hemmung, wie oben beschrieben, erzeugten.

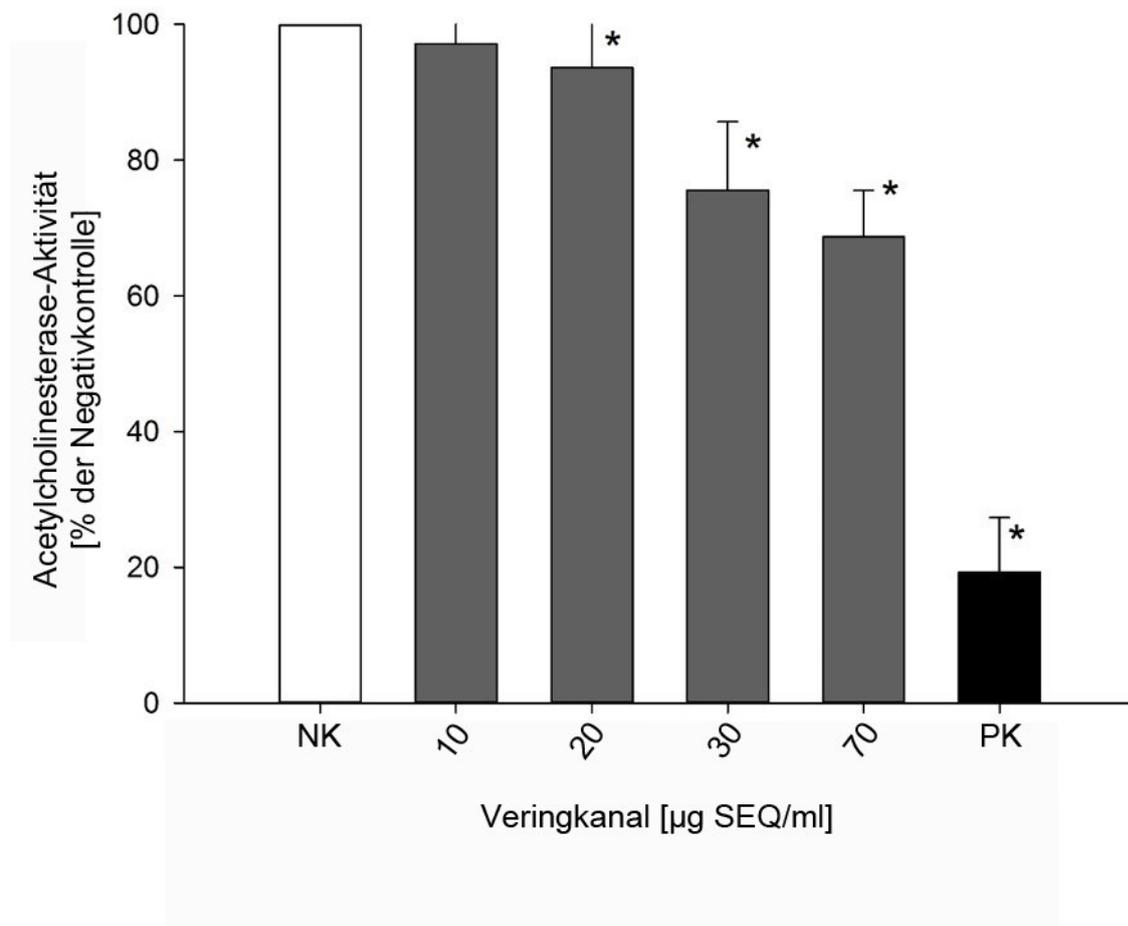


Abb. 47: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten in Pools von fünf 96 h alten Embryonen des Zebraärlings nach einer 96 h-Exposition gegenüber den Sedimentextrakten aus dem Veringkanal in Konzentrationen von: 10, 20, 30 und  $70 \mu\text{g SEQ/ml}$ . Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (NK) ausgedrückt. Paraoxon-methyl ( $2 \text{ mg/L}$ ) wird als Positivkontrolle (PK) angegeben, ( $n=3$ ). (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle  $p < 0,05$  (Einweg-ANOVA, Dunn-Test). Alle Embryonen die mit einer Konzentration  $\geq 20 \mu\text{g SEQ/ml}$  Sedimentextrakt aus dem Veringkanal exponiert worden sind, zeigen einen signifikanten Unterschied in der spezifischen Acetylcholinesterase-Aktivität zur Negativkontrolle.

### 3.3.4 Dotierung des Sedimentextrakts aus dem Veringkanal mit Chlorpyrifos

Da komplexe Umweltproben, Gemische aus mehreren Substanzen und deren Metabolite sind, sollte in der vorliegenden Studie überprüft werden, ob es eventuell eine antagonistische Wirkung gegenüber Hemmstoffen der Acetylcholinesterase-Aktivitäten in der Probe aus dem Veringkanal gibt. Dies sollte mithilfe eines Kombinationstests mit der Zugabe von 0,6 mg/L Chlorpyrifos überprüft werden. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, in welchem Ausmaß die Antwort der Acetylcholinesterase-Aktivität moduliert werden könne.

Tatsächlich zeigte das mit Chlorpyrifos dotierte Sedimentextrakt vom Veringkanal eine gesteigerte Hemmung, die aber nicht stärker als Chlorpyrifos alleine war. Das dotierte Sediment und Chlorpyrifos als Monosubstanz zeigten gemittelte Acetylcholinesterase-Aktivitäten von ca. 18 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle und entspricht einer Reduktion von ca. 82 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle (Abb. 48). Im Gegensatz dazu veränderte sich die Acetylcholinesterase-Aktivität des isolierten Sedimentextrakts vom Veringkanal nicht und blieb bei ca. 62 % der Acetylcholinesterase-Aktivität der Negativkontrolle.

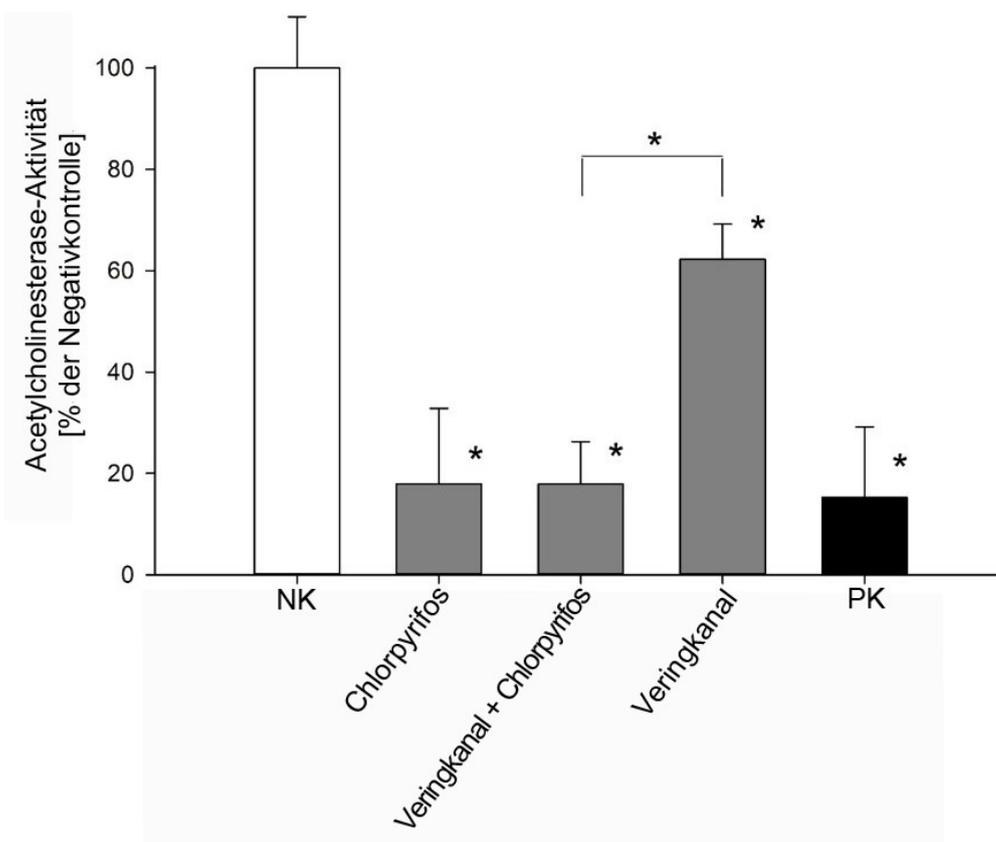


Abb. 48: Spezifische Acetylcholinesterase-Aktivitäten in Pools von fünf 96 h alten Embryonen des Zebrafischs nach einer 96 h-Exposition gegenüber 0,6 mg/L Chlorpyrifos, 33 µg SEQ/ml Sedimentextrakt vom Veringkanal + 0,6 mg/L Chlorpyrifos und 33 µg SEQ/ml Sedimentextrakt vom Veringkanal als Monosubstanz. Die Hemmung wird als Prozent der Negativkontrolle (NK) ausgedrückt. Paraoxon-methyl (2 mg/L) wird als Positivkontrolle (PK) angegeben, (n=3). (\*) Kennzeichnet die signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle  $p < 0,05$  (Einweg-ANOVA, Dunn-Test). Alle Embryonen die mit Chlorpyrifos und/oder mit dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal exponiert worden sind, zeigen einen signifikanten Unterschied in der spezifischen Acetylcholinesterase-Aktivität zur Negativkontrolle.

## DISKUSSION

### 4.1 FET

#### 4.1.1 EC<sub>10</sub>-Werte als Testkonzentration zur Bestimmung spezifischer Toxizität

In der toxikologischen Risikobewertung und in der Chemikalienregulierung wurden lange Zeit die LC<sub>50</sub>-Werte und im geringeren Maße auch die EC<sub>50</sub>-Daten verwendet, um das toxische Potenzial von Chemikalien zu vergleichen (OECD, 2013; Scholz et al., 2013; 2008). Das Screening allerdings auf spezifische Wirkungsweisen bei solch hohen Konzentrationen ist fraglich, da sekundäre (indirekte) Auswirkungen auf die spezifischen Endpunkte nicht ausgeschlossen werden können. Endokrine Systeme, insbesondere solche, die mit allgemeinen Stressreaktionssystemen in Verbindung stehen, werden fast zwangsläufig reagieren, wenn nur die Testkonzentrationen hoch genug sind (EPA, 2007; Kloas et al., 2009; Scholz et al., 2013; Söffker and Tyler, 2012; Tyler et al., 1998).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass unangemessen hohe Testkonzentrationen spezifische adaptive Reaktionen wie die Induktion verschiedener Formen von Cytochrom P450 maskieren (Heinrich et al., 2014; Kais et al., 2018; 2017). Im Hinblick auf die Aktivität der Acetylcholinesterase-Aktivität können z.B. unspezifische Toxine Enzymaktivitäten nicht nur durch direkte Wechselwirkung mit dem Enzym modulieren, sondern auch die Expression bzw. Biosynthese der Acetylcholinesterase behindern oder eine neuronale Zelldegeneration auslösen. Da die vorliegende Studie nach Antworten spezifischer toxikologischer Endpunkte sucht, wurden die EC<sub>10</sub>-Konzentrationen ausgewählt. Bei dieser Testkonzentration sind nur begrenzt negative Auswirkungen auf die allgemeine Physiologie zu erwarten, aber immer noch hoch genug, um adaptive Reaktionen und Induktionen von biochemischen Reaktionen auszulösen (Braunbeck, 1992, 1994, 1998).

#### 4.1.2 Methylquecksilberchlorid

Die auffälligsten Wirkmechanismen des Modell-Umweltgiftes: Methylquecksilberchlorid waren Wirbelsäulenverkrümmungen und Missbildungen der Schwanzspitze. Die Schwanzspitzenverkrümmung wurde ebenfalls von Yang et al. (2010) beschrieben, die eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Flossenfalte und des Schwanzflossen Primordiums mit Hilfe von in situ-Hybridisierung beobachtet hat. Ihre Daten deuten darauf hin, dass Methylquecksilberchlorid die Schwanzentwicklung zumindest teilweise durch Aktivierung bestimmter Proteasen, die für den Gewebsumbau (Mmp9 und Mmp13) zuständig sind, beeinträchtigt. Die Veränderungen der Transgenexpression wurden bereits bei 6 µg/L Methylquecksilberchlorid festgestellt und liegen somit weit unter dem EC<sub>10</sub>-Wert (33 µg/L), der allerdings aufgrund von morphologischen Veränderungen im Embryo ermittelt worden ist.

Neben der breiten Palette von unspezifischen subletalen Effekten wie Perikardödeme, verminderte Durchblutung und reduzierter Herzschlag, ist Methylquecksilber aber v.a. neurotoxisch und wirkt auf das zentrale und periphere Nervensystem. Yu et al. (2011) konnten beim Zebrafisch mit Hilfe toxikogenomischer Untersuchungen 24 Gene identifizieren, die bei einer Exposition gegenüber Methylquecksilber signifikant im Gehirn hochreguliert wurden. Zusätzlich beobachtete sie noch einen Verlust von Neuromastzellen im Seitenlinienorgan.

Die neurotoxische Wirkung in der vorliegenden Studie wurde v.a. in den unkontrollierten Schwimmbewegungen der Embryonen, die bis hin zu Krämpfen und paralytischen Erscheinungen führten, beobachtet.

### 4.1.3 Chlorpyrifos

Das embryotoxische Potential von Chlorpyrifos zeigte eine eindeutig positive Dosis-Wirkungs-Beziehung in Embryonen des Zebrafisches. Der ermittelte  $EC_{10}$ -Wert von 0,6 mg/L entspricht den Daten von Kienle et al. (2009), die bei 96 h alten Embryonen ab 0,5 mg/L Chlorpyrifos, Wirbelsäulenverkrümmungen beschrieben haben. Neben den morphologischen Veränderungen beobachteten Jin et al. (2015), Kienle et al. (2009) sowie Levin et al. (2004) auch charakteristische Verhaltensdefizite, wie eine verminderte Schwimmaktivität und Muskelzuckungen bei noch niedrigeren Konzentrationen von 0,1-0,3 mg/L Chlorpyrifos. Diese Ergebnisse, aber auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie, bestätigen die Notwendigkeit, bei Konzentrationen  $\leq EC_{10}$ -Werten zu testen, um spezifische Wirkungsweisen aufzuzeigen (Stengel et al., 2017).

In Bezug auf die Variabilität der  $EC$ -Daten von Chlorpyrifos in der Literatur verwendeten viele Studien statische Systeme mit nominalen Konzentrationen, obwohl mehrere Studien eine niedrigere Wiederfindungsrate von Chlorpyrifos beschrieben haben. Kienle et al. (2009) z.B. konnte mittels GC-MS eine Wiederfindungsrate von Chlorpyrifos von nur ca. 51,6 % erfassen. Tilton et al. (2011) beobachteten bereits nach 24 h bei einer statischen Exposition der Fische, einen Rückgang der Konzentration von Chlorpyrifos um mehr als 80 %. Dies verdeutlicht die effiziente Aufnahme von Chlorpyrifos durch Fische. Da die vorliegende Studie allerdings ein semistatisches Expositionsszenario verwendete, sollte eine konstante Verteilung von hydrophoben Substanzen wie Chlorpyrifos im Medium gewährleistet sein.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass die meisten Effekte erst nach 72 h auftraten und somit offensichtlich die Toxizität von Chlorpyrifos zeitabhängig war. Da der Schlupf der Embryonen üblicherweise im Alter von 72 h beginnt, könnte die Zunahme der Toxizität allerdings auch auf eine erleichterte Aufnahme nach dem Schlupf zurückzuführen zu sein.

Die meisten Effekte wie Perikardial- und Dottersacködeme oder Wirbelsäulenverkrümmungen und unkontrollierte Bewegungen, wie Zuckungen in Embryonen des Zebrafisches wurden im Allgemeinen bereits als unspezifische Effekte beschrieben (Bachmann, 2002; Carney et al., 2006; Jin et al., 2015; Lee et al., 2007; Quilang, 2008) und häufig mit kardiovaskulären Dysfunktionen verbunden (Barron et al., 2004; Billiard et al., 2008; Carney et al., 2006; Sundberg et al., 2005). Ein spezifischerer Effekt nach einer Chlorpyrifos-Exposition war v.a. die beschriebene Aberration im Schwimmverhalten in Verbindung mit einer Wirbelsäulenverkrümmung und wurden ebenfalls von Jin et al. (2015); Kienle et al. (2009); Levin et al. (2004) und Straus et al. (2000) beschrieben.

### Chlorpyrifos + $\beta$ -Naphthoflavon

Die kombinierte Exposition mit Chlorpyrifos und 10  $\mu\text{g/L}$   $\beta$ -Naphthoflavon führte nach 120 h zu einer Zunahme der Toxizität von ca. 40 % gegenüber der Monosubstanz Chlorpyrifos. Nach Neal and Halpert (1982) ist das Schwefelatom, das während Entgiftungsprozessen aus Phosphorhionaten und somit auch aus Chlorpyrifos freigesetzt wird, sehr reaktiv und könnte sofort an das Eisen der Hämgruppe von Cytochrom P450 binden und die Enzymaktivität inhibieren. Ein erhöhter Gehalt an reaktiven Schwefel, der durch  $\beta$ -Naphthoflavon erzeugt werden kann, könnte für die gesteigerte Toxizität nach einer kombinierten Exposition mit Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon verantwortlich sein.  $\beta$ -Naphthoflavon, ein synthetisches Flavon, induziert das CYP1A Protein und die EROD-Aktivität etwa dreimal so hoch wie die Negativkontrolle (Troxel et al., 1997b). Eine gleichzeitige Exposition gegenüber Chlorpyrifos und  $\beta$ -Naphthoflavon induziert somit eine dreifache Menge an CYP1A Protein und verursacht dementsprechend eine dreifache EROD-Aktivität mit der entsprechenden gesteigerten Bildung von reaktiven Schwefel. Dieser vermehrt gebildete Schwefel konkurriert wiederum mit dem Substrat für die aktive Stelle von CYP1A und führt zur Hemmung der Entgiftungsprozesse. Die Potenzierung der akuten Toxizität von Chlorpyrifos durch Vorbehandlung mit  $\beta$ -Naphthoflavon wurde bereits von Sultatos et al. (1985) beschrieben. Insbesondere die gesteigerte Toxizität in Bezug auf die kardiovaskulären Effekte wurden von Billiard et al. (2006), Brown et al. (2015), Wassenberg and Di Giulio (2004) sowie Wassenberg et al. (2005), dargestellt. Alle diese Publikationen bestätigen unsere beobachtete Zunahme von mehr als 40 % der Toxizität nach der kombinierten Exposition von Chlorpyrifos und  $\beta$ -Naphthoflavon.

#### 4.1.4 Bisphenol A

Bisphenol A zeigte bei Konzentrationen  $\geq 6$  mg/L ähnliche unspezifische subletale Effekte, wie bereits oben beschrieben: Dottersack- und Perikardialödeme, Kieferdeformationen und Wirbelsäulenverkrümmung. Aber besonders auffällig war die hohe Rate des verzögerten Schlupfes nach 96 h. Ein interessanter Grenzwert scheint hierbei 6 mg/L zu sein, bei dem die Embryonen sehr unterschiedlich reagierten und äußere Umstände wie Temperatur, Stress und allgemeine Fitness eine entscheidende Rolle spielten. Diese Variabilität spiegelt sich in der relativ hohen Standardabweichung von 32,5 % bei 6 mg/L wider. Saili et al. (2012) bestätigt diesen Grenzwert. Sie führten ebenfalls Toxizitäts-Assays mit Embryonen des Zebrafisches über 120 h durch und stellten fest, dass erst sehr hohe Konzentrationen  $\geq 70$   $\mu\text{M/L}$  (ca. 16 mg/L) zu einer Mortalität und Konzentrationen  $\leq 30$   $\mu\text{M/L}$  (ca. 6,8 mg/L) zu keinerlei Effekten führten. Da Bisphenol A zu den endokrinen Disruptoren gehört und somit in sehr niedrigen Konzentrationen durch Veränderung des Hormonsystems die Entwicklung des Embryos beeinträchtigt, zeigen sich die entsprechenden Dysfunktionen erst mit zunehmendem Alter. Bisphenol A ist daher für die Darstellung der akuten Toxizität mithilfe des FETs, der auf morphologische Veränderungen basiert, eher weniger geeignet. Um eine Auswirkung von Bisphenol A auf die frühe Embryonalentwicklung genauer zu untersuchen, sollte man wie Tse et al. (2013) spezielle molekulare Marker über *In-situ*-Hybridisierung verwenden.

#### 4.1.5 Aroclor 1254

Der Text des folgenden Abschnitts: 3.04.1.5 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*” Sci Total Environ; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Ein auffälliges Ergebnis war, dass Aroclor 1254 in allen FETs eine deutlich verzögerte Toxizität zeigte. Angesichts des hohen  $\log K_{ow}$  von 6,79, wurde die Exposition ebenfalls mit dechorionierten Embryonen durchgeführt, um eine mögliche Barrierefunktion des Chorions zu klären. In der Tat bestätigten Dechorionierungs-Experimente, dass dechorionierte Embryonen deutlich früher Effekte zeigten als die chorionierten.

Das Chorion des Zebraäbrblings ist eine 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  dicke azelluläre Hülle, die aus drei Schichten besteht, deren mittlere und innere von Porenkanälen durchdrungen sind (Rawson et al., 2000). Angesichts des engen Durchmessers der Poren und der negativen Ladung des Chorions (Bodewein et al., 2016) wird vermutet, dass diese die Aufnahme von Verbindungen aufgrund ihrer Größe (Pelka et al., 2017) und/oder Ladungspotentials beschränken. Aroclor 1254 ist chemisch relativ inert und resistent gegen Oxidation oder Reduktion. Physikalische und chemische Eigenschaften variieren mit dem Chlorierungsgrad (UNEP-Chemicals, 1999). Der Chlorierungsgrad wird in Nummern im Namen des PCBs angegeben, je höher diese Nummer ist, desto höher ist der Anteil an hochchlorierten PCB in einer Mischung (Walker et al., 2012). Einzelne Kongenere von PCBs variieren in ihrer Stereochemie in Abhängigkeit von der Position der Substitution durch Chloratome. Aufgrund der Sperrigkeit von Chloratomen führt die *ortho*-Substitution zu einer kugelförmigeren und voluminöseren Konformation der Moleküle. Chloratome beeinflussen zahlreiche Parameter der Moleküle, wie Polarität, sterische Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen und die allgemeine strukturelle Konfiguration. Die ionisierbaren Gruppen von Aroclor 1254 sind ein wichtiger Aspekt für sein Verhalten in Wasser und der Fähigkeit, das Chorion zu passieren und könnte somit für die in der vorliegenden Studie beobachtete Toxizitätsverzögerung verantwortlich sein.

Ein weiterer entscheidender Aspekt ist die Chemikalienexposition bzw. -aufnahme nach dem Schlupf. Vor dem Schlüpfen beruht die Aufnahme von Chemikalien fast ausschließlich auf Diffusionsprozessen, die in erster Linie von der Lipophilie und spezifischen molekularen Eigenschaften wie Polarität und der sterischen Konfiguration abhängen (Jones, 2010). Angesichts des relativ hohen Chlorgehalts und der ausgeprägten Lipophilie wird die Diffusionsgeschwindigkeit von Aroclor 1254 als eher langsam angenommen (Brauer, 2012). Nach dem Schlupf der Embryonen des Zebraäbrblings (nach 72 h) ändert sich nicht nur die embryonale Physiologie, sondern auch die Xenobiotika-Exposition. Erst nach dem Schlupf öffnet sich der Mund und die Kiemen erlangen ihre volle Funktionsfähigkeit, sodass die Exposition nun über die stark vergrößerte Oberfläche des Vorderabschnitts des Darms und der Kiemen stattfinden kann (Kimmel et al., 1995). Das Vorhandensein von funktionellen Kiemen und das zunehmende Potenzial nach 120 h für eine ernährungsbedingte Exposition gegenüber Xenobiotika, scheinen für die Zunahme der Absorption und Toxizität von Aroclor 1254 nach dem Schlüpfen entscheidend zu sein.

Zu berücksichtigen ist auch, dass Aroclor 1254 aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser (12-70  $\mu\text{g/L}$ ; Sklarew and Girvin, 1987) mit einer relativ hohen Lösungsmittelkonzentration von 0,2 % DMSO appliziert werden musste und damit deutlich höher als in dem OECD

Technical Guidance Paper for Difficult Substances vorgegebenen Wert von 0,01 %, lag. Frühere Studien zeigten, dass DMSO-Konzentrationen von 0,1 und 1 % in den Testlösungen die Aufnahme über das Chorion erleichterten und somit eine erhöhte Bioverfügbarkeit gegeben ist (Kais et al., 2013). Die Studie zeigt aber auch, dass die erhöhte Permeabilität des Chorions durch DMSO begrenzt war und dass andere Parameter wie Polarität und die sterische Konfiguration dominanter Merkmale waren, die über die Passage über das Chorion entschieden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, enthielten folglich alle Aroclor 1254 Expositionen eine identische DMSO-Konzentration von 0,2 %.

#### 4.1.6 Chinolin

Der Text des folgenden Abschnitts 4.1.6 basiert auf der von mir betreuten Bachelorarbeit von Ellen Steudle (2012): „*Fischembryotoxizität und Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität von Chinolin im Zebrafisch (Danio rerio)*“ und wurde von mir umgeschrieben.

Besonders auffällig bei den Versuchen mit Chinolin war, dass Effekte v.a. auftraten, wenn die Embryonen in den ersten 30 min belastet worden waren (4-er Zellstadium). Versuche, in denen die Embryonen im 8er- und 16er- Zellstadium belastet wurden, zeigten bereits deutlich spätere und weniger ausgeprägte Effekte. Bei einer noch späteren Exposition (4 h nach Befruchtung) konnten bei der gleichen Konzentration auch zu einem späteren Zeitpunkt keinerlei Effekte nachgewiesen werden. Gellert and Heinrichsdorff (2001) beschrieben einen ähnlichen Effekt. Sie exponierten 0,25 bis 4 h alte Embryonen mit Abwasserproben und zeigten, dass bereits bei einer Exposition von 1 h alten Embryonen kein signifikanter Unterschied in der Mortalitätsrate zur Negativkontrolle mehr bestand. Ein Erklärungsansatz könnte eine erst nach dieser Zeit vollendete Aushärtung des Chorions sein. Während der Entwicklung verändert sich sowohl die Chorionstruktur als auch die Permeabilität. Das Chorion härtet in den ersten Stunden nach der Befruchtung aus und verhindert so eine Polyspermie, schützt den sich entwickelnden Embryo und führt zu einer verminderten Permeabilität (Pelka et al., 2017). Später nach 48 h nimmt die Permeabilität des Chorions wieder zu (Kais et al., 2013). Chinolin scheint somit eine Substanz zu sein, bei der das ausgehärtete Chorion als Barriere fungiert. Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, müssten weitere Versuche mit dechorionierten Embryonen durchgeführt werden.

Die Exposition gegenüber Chinolin verursachte v.a. meist letale Effekte, die bereits nach 24 h auftraten und über den gesamten Expositionszeitraum nicht weiter zunahmen. Ramos et al., 1998 beschrieben ebenfalls, dass sich die LC<sub>50</sub>-Werte bei adulten Guppies nach 24 h nicht sehr von denen nach 96 h unterschieden und führte dies auf eine schnelle Äquilibrationszeit zurück. Sie begründeten diese mit einer zeitnahen Eliminierung des Fremdstoffes, sodass sich relativ schnell wieder ein Gleichgewicht einstellen konnte. In jedem Fall zeigen beide Studien eine starke, akute toxische Wirkung von Chinolin auf Fische, wobei die Embryonalstadien des Zebrafisches der vorliegenden Studie auf deutlich niedrigere Konzentrationen reagierten als die adulten Guppies bei Ramos et al. (1998).

Für weitere Details zum FET mit Chinolin, siehe Bachelorarbeit von Ellen Steudle (2012): *Fischembryotoxizität und Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität von Chinolin im Zebrafisch (Danio rerio)*.

#### 4.1.7 2,3-Benzofuran

Der Text des folgenden Abschnitts 4.1.7 basiert auf der von mir betreuten Bachelorarbeit von Katharina Heye (2012): „Die Wirkung von 2,3-Benzofuran auf Cytochrom P<sub>450</sub> 1A in der Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*)“ und wurde von mir umgeschrieben.

Vergleicht man den hier ermittelten EC<sub>50</sub>-Wert (18,62 mg/L) mit dem publizierten LC<sub>50</sub>-Wert: 14 mg/L der Dickkopfeleritze von Russom et al. (1997) nach 96 h Durchfluss, so scheint die Toxizität im adulten Fisch in der Dickkopfeleritze um ein vielfaches höher zu sein als im Embryo des Zebraäbrblings. Obwohl Lammer et al. (2009) eine exzellente Korrelation zwischen Daten über akute Toxizität der Fische und dem Fischembryotest nachweisen konnte, zeigte sie, dass die Tests mit der Dickkopfeleritze eher eine geringere Korrelation aufwiesen, so dass ein Vergleich der Daten nur unter Vorbehalt unternommen werden sollte.

Eine Möglichkeit für die gesteigerte Toxizität in adulten Dickkopfeleritzen könnte die hohe Nierentoxizität von 2,3-Benzofuran sein (NTP, 1989), die sich durch eine eingeschränkte Eliminierung zu Nekrosen in der Niere direkt oder sich in teratogenen bis letalen Effekten ausprägen kann. Eine verminderte Aufnahme über das Chorion ist eher auszuschließen, da die Effekte nach dem Schlupf rückläufig waren und vielmehr auf eine gesteigerte Akkumulation bzw. höhere Expositionskonzentration innerhalb des Chorions hinweisen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, müsste die perivitelline Flüssigkeit punktiert und chemisch analysiert werden, damit man Aufschluss über die tatsächliche Konzentration von 2,3-Benzofuran im Ei erlangen kann.

Das vermehrte Auftreten von Ödemen könnte ebenfalls auf die stark nierenschädigende Wirkung von 2,3-Benzofuran zurückzuführen sein. So konnten Drummond et al. (1998) und Hentschel et al. (2005) im Zebraäbrbling einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Aufkommen von Ödemen und einer gestörten Osmoregulation im geschädigten Pronephros (Vorstufe zur Niere in Fischembryonen) nachweisen.

Das National Toxicology Program (NTP, 1989) hat durch eine Belastung von Mäusen mit 2,3-Benzofuran (250 mg/kg/d für 13 Wochen; 30 mg/kg/d für 103 Wochen) eine Abnahme der Knochendichte (Osteoporose) beobachtet. Aufgrund der schweren Nierenschädigung beobachteten sie ein Ungleichgewicht im Mineralhaushalt, z.B. wurde ein stark verminderter Gehalt von Phosphat und Calcium festgestellt. Dies könnte in unserer Studie das vermehrte Auftreten von Skoliose, sowie Brüche in der Schwanzspitze im Embryo des Zebraäbrblings erklären.

Da 2,3-Benzofuran auch wie Chinolin zu der Gruppe der Heteroaromaten gehört, wurden ebenfalls verschiedene Tests mit unterschiedlichen Expositionsbeginn (4, 8-Zellstadium, 2, 4, 8 und 24 h, Daten hier nicht gezeigt) durchgeführt. Es zeigten sich sowohl nach dem frühesten als auch nach dem spätesten Expositionsbeginn keine Unterschiede in der Häufigkeit von subletalen oder letalen Effekten in 72 h alten Embryonen.

Für weitere Details zum FET mit 2,3-Benzofuran, siehe Bachelorarbeit von Katharina Heye (2012): Die Wirkung von 2,3-Benzofuran auf Cytochrom P<sub>450</sub> 1A in der Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*).

#### 4.1.8 Sedimentextrakte

Der Text des folgenden Abschnitts 3.04.1.8 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo EROD assays with the zebrafish (Danio rerio) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity*” *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Im Rahmen des DanTox-Projekts wurden insgesamt 40 PAKs einschließlich der 16 Standard-EPA-PAKs analysiert. Die FET-Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen eindeutig das stärkste toxische Potenzial für Extrakte aus dem Veringkanal. Die chemische Analyse des Sediments aus dem Veringkanal zeigte bei weitem die höchste Belastung mit PAKs (s. Tab. 2; Hafner et al., 2015). Die Exposition gegenüber PAKs verursachen eine Reihe von subletalen Effekten. Oft werden die Effekte mit dem „*blue sac disease*” (Barron et al., 2004) in Verbindung gebracht und schließen Perikard- Dottersacködeme, Störungen der Herzfunktion und diverse Missbildungen ein (Billiard et al., 2008; Sundberg et al., 2005). Aber auch TCDD und andere AhR-Liganden werden als kardiotoxisch in den frühen Embryonalstadien beschrieben (Barron et al., 2004; Handley-Goldstone et al., 2005; Olivares et al., 2013).

Phenanthren, genauer gesagt die Methyl- und Phenyl-derivate von Phenanthren, wurden in hohen Konzentrationen im Sediment aus dem Veringkanal und in geringeren Konzentrationen in den Sedimenten der Rheinstandorte Altrip und Ehrenbreitstein nachgewiesen. Methylphenanthren verursacht eine Vielzahl von teratogenen Effekten in den frühen Lebensstadien von Fischen, einschließlich Fehlbildungen und Dysfunktionen des perikardialen Gefäßsystems sowie Missbildungen der Wirbelsäule (Billiard et al., 2008; Mu et al., 2014; Wolińska et al., 2011). Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse stehen im Einklang mit unseren Beobachtungen. Die beschriebenen Effekte gelten jedoch auch als typisch für die Exposition gegenüber dioxinähnlichen Verbindungen (Carney et al., 2006; Goldstone and Stegeman, 2006). Daher erscheint es schwierig, wenn nicht unmöglich, verursachende Kontaminanten in Sedimentextrakten aus teratogenen Standardwirkungen zu identifizieren.

Dies gilt umso mehr, wenn man bedenkt, dass Sedimentauszüge komplexe Chemikaliengemische sind und es höchst unwahrscheinlich ist, dass nur ein oder zwei Stoffe oder gar Gruppen von organischen Schadstoffen für solche Effekte allein verantwortlich sein sollen (Karlsson et al., 2008; Mayer and Reichenberg, 2006). Es ist eher anzunehmen, dass in komplexen Umweltproben eine kombinierte Toxizität vorliegt (Smital et al., 2013) und Substanzklassen wie PAKs, PCBs, Dioxine, Furane, Herbizide und Pestizide in der Regel an der Embryotoxizität komplexer Umweltproben mit beteiligt sind (Incardona et al., 2004; King-Heiden et al., 2012). Auch wenn einzelne PAKs nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind, wie dies bei den beiden Rheinsedimenten der Fall ist, sind additive und synergistische Effekte höchstwahrscheinlich für die Embryotoxizität mitverantwortlich (Billiard et al., 2008).

## 4.2 Live-Imaging-EROD-Assay

### 4.2.1 CYP1-Induktion während der embryonalen Entwicklung

Der Text des folgenden Abschnitts: 3.04.2.1 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo EROD assays with the zebrafish (Danio rerio) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity*” *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Neben den Entgiftungsprozessen spielen verschiedene CYP1-Enzyme eine entscheidende Rolle in der normalen Embryonalentwicklung (Choudhary et al., 2004, 2006). Für ein besseres Verständnis dieses Grundinduktionsmusters während der Embryonalentwicklung, wurden eine Reihe von CYP1-Messungen mit 24, 48, 72, 96 und 120 h alten Embryonen des Zebrafisblings mit dem Live-Imaging-EROD-Assay durchgeführt. Nach Exposition gegenüber dem Modellinduktor  $\beta$ -Naphthoflavon zeigten Embryonen bis 48 h kein Signal in der Leber, aber nach 24 h ein helles Signal im Gehirn, Augen und Otolithen, das nach 48 h abnahm (Abb. 26). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Jönsson et al. (2007a; b) überein. Sie zeigten, dass die basale Expression von CYP1B1 innerhalb der ersten zwei Tage im Gehirn, Herz und Augen ihren Höhepunkt erreichte. Es ist bekannt, dass CYP1B1 essentiell für die normale Entwicklung des Auges ist (Choudhary et al., 2006; Libby et al., 2003). Es ist ebenfalls bekannt, dass CYP1B1 in der Lage ist, Ethoxyresorufin zu Resorufin zu deethylieren, jedoch mit einer niedrigeren Rate als CYP1A und CYP1C1 (Stegeman et al., 2015). Die Rolle von CYP1B1 bei Entgiftungsprozessen bleibt jedoch unklar. Daher ist der angenommene Anstieg von CYP1B1 nach 24 Stunden in den Augen höchstwahrscheinlich auf die Augenbildung zurückzuführen. Während sich die Netzhaut bereits nach 30 h entwickelt, beginnt die visuelle Wahrnehmung erst um den Zeitpunkt des Schlupfes (Easter and Nicola, 1996). In jedem Fall haben Jönsson et al. (2007a) zeigen können, dass der CYP1B1-Gehalt in den folgenden 96 h deutlich abnahm und stimmt mit unserem beobachteten Abfall des Signals in den Augen bereits nach 24 h überein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die zeitliche Entwicklung der Leber im Embryo des Zebrafisblings, da die Leber die höchste basale Expression von CYP1A aufweist (Jönsson et al., 2007a; b). Obwohl 8 h alte Embryonen des Zebrafisblings mehrere Cytochrom P450-Aktivitäten zeigen (Jönsson et al., 2007a; Otte et al., 2010), gibt es einen deutlichen Anstieg, insbesondere in der CYP1A-Aktivität von 72 h alten Embryonen (Bräunig et al., 2015; Jönsson et al., 2007b). Korzh et al. (2008) beobachtete, dass die Vaskulogenese in der Leber nach 55 h und die funktionelle Blutzirkulation in der Leber nach 72 h initiiert wurde. In 72 h alten Embryonen wuchs die Leber aktiv und dehnte sich lateral weiter aus. Korzh et al. (2008) beschrieben die Bildung von drei verschiedenen Leberlappen. Der erste (linke) Lappen, der ebenfalls in Abb. 26 ( $\geq 72$ h) zu sehen ist, bildete sich nach Korzh et al. (2008) nach ca. 80 h und nahm nach etwa 84 und 120 h signifikant in der Größe zu. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse in der vorliegenden Studie, die ebenfalls eine Größen- sowie Signalintensitätszunahme in der Leber beobachtet hat. Gemäß dieser frühen Bildung stellt der linke Leberlappen ein nützliches Substrat zur Untersuchung der frühen *In vivo*-EROD-Aktivität in den Embryonen des Zebrafisblings direkt in der Leber dar. Die Signalintensität nimmt mit der fortschreitenden Entwicklung der Leber zu und erleichtert somit die Auswertung des Fluoreszenzsignals. Als Konsequenz scheinen 96 und 120 h alte Embryonen die am besten

geeigneten Entwicklungsstadien zu sein, um die *In vivo*-EROD-Aktivität in dem Live-Imaging-EROD-Assay zu untersuchen.

Aus technischer Sicht hängt die Visualisierung der CYP1A-Induktion auch stark von der angewandten Technologie ab: Otte et al. (2010) z.B. präsentierten den *In vivo*-Live-Imaging-EROD-Assay, um v.a. die basale und induzierte CYP1A-Aktivität in sehr frühen Entwicklungsstadien (ab 8 h) darzustellen. Dementsprechend waren die Induktionsbereiche klein und die Signale waren sehr schwach. Als Konsequenz wurde die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) verwendet, die eine deutliche Verstärkung der Signalintensitäten erlaubten. Das CLSM eignet sich besonders um Strukturen zu analysieren, sowie in Abschnitt 3.23.2.2 beschrieben, zur Klärung des zusätzlichen Signals neben dem Signal der Leber. Allerdings bestand der Zweck der hier vorliegenden Studie darin, ein schnelles, kostengünstiges und einfach zu handhabendes Werkzeug zum Screening dioxinähnlicher Substanzen in Umweltproben zu entwickeln. Für Routinezwecke erwies sich daher das Epifluoreszenzmikroskop als weniger aufwendig in der Handhabung, erlaubte einen schnelleren und höheren Durchsatz an Untersuchungstieren als am CLSM und ermöglichte außerdem die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung.

#### 4.2.2 Zeitabhängiges EROD-Induktionspotential

Der Text des folgenden Abschnitts 3.04.2.2 basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo EROD assays with the zebrafish (Danio rerio) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity*” Sci Total Environ 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Um Schwankungen der CYP1A-Aktivität aufgrund von erhöhter Akkumulation von Xenobiotika im Gewebe zu vermeiden, wurden die Expositionszeiten sukzessiv reduziert. Letztendlich bekamen wir bereits nach einer 3 h-Exposition bei 96 und 120 h alten Embryonen stabile Ergebnisse. Mehrere Studien konnten bereits eine schnelle CYP1A-Induktion und entsprechende EROD-Aktivitäten nach einigen Stunden Exposition in verschiedenen Testsystemen nachweisen (Jönsson et al., 2009; Noury et al., 2006; Wei et al., 1998). Der Vergleich der 3 h-Exposition und der kontinuierlichen Exposition zeigten keine Unterschiede in der Signalintensität, jedoch im Muster der Induktion. Der fluoreszierende Bereich, insbesondere bei den 72 h alten Embryonen der Kurzzeitexposition, erschien von der Fläche immer etwas kleiner und deutlich abgegrenzter als der nach einer kontinuierlichen Exposition. Eine histopathologische Studie von Ostrach et al. (2008) zeigte, dass die Lebern von 72 h alten Embryonen, die mit kontaminierten Flusswasser exponiert wurden, viel weiterentwickelter und signifikant größer waren als die der Kontrollgruppe. Das Lebergewebe zeigte eine sehr unterschiedliche Zellarchitektur und einen reichlich angelegten Glycogenspeicher. Dieser Zustand änderte sich mit fortschreitendem Alter, die Lebern von 120 h alten mit Flusswasser exponierten Embryonen schienen von der Größe geschrumpft zu sein, die zelluläre Architektur wurde undeutlich und z.T. zurückgebildet, die Hepatozyten waren mittlerweile frei von Glykogen und es wurden nukleare Bündelungen beobachtet. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die Lebern der Kontrollgruppe normal, sie wuchsen weiter, zeigten fortschrittliche zelluläre Architektur, Morphologie und reichlich Glycogenvorräte (Ostrach et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie scheinen dieses vorübergehend verstärkte Wachstum in

72 h alten Embryonen zu bestätigen, sowie auch das z.T. beobachtete rückläufige Signal in 120 h alten Larven durch eine anfangende Leberschädigung erklärt werden könnte.

### 4.2.3 Live-Imaging-EROD-Assay mit Monosubstanzen

#### Methylquecksilberchlorid

Wie die Struktur und die chemischen Eigenschaften von Methylquecksilber vermuten ließen, erzeugte es in keiner Konzentration und in keinem Entwicklungsstadium eine CYP1A-Induktion oder – Inhibierung.

#### Chlorpyrifos als Inhibitor für die EROD-Aktivität

Der Text des folgenden Abschnitts: „*Chlorpyrifos als Inhibitor für die EROD-Aktivität*“ basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*“ Sci Total Environ; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Nach der Exposition gegenüber Chlorpyrifos als Monosubstanz war das Fluoreszenzsignal für eine Analyse zu schwach. Die kombinierte Exposition gegenüber Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon zeigte nach 72 h eine deutliche Verringerung der durch  $\beta$ -Naphthoflavon induzierten EROD-Aktivität. Nach 96 und 120 h wurde das Fluoreszenzsignal komplett gehemmt und weist daraufhin, dass Chlorpyrifos als Inhibitor für CYP1A wirkt. Nach dem Wissen der Autorin stellt diese Studie bis heute den ersten *In vivo*-Ansatz zur Visualisierung der Hemmung von Cytochrom P450 durch Chlorpyrifos in den Embryonen des Zebrafisch dar. Wie bereits oben diskutiert, kann die Inhibierung von Cytochrom P450 durch reaktiven Schwefel verursacht werden (Neal and Halpert, 1982), der als Nebenprodukt des Entgiftungsprozesses entsteht (Fukuto, 1990; Straus et al., 2000; Tang et al., 2002) und letztendlich zu einem erhöhten Gehalt an reaktiven Schwefel führt.

Während allgemein anerkannt ist, dass die Dioxin-bedingte Toxizität größtenteils durch den Ah-Rezeptor (AhR) vermittelt wird, wird die Rolle von CYP1A bei der Verursachung von Toxizität an sich kontrovers diskutiert. Einerseits haben mehrere Studien gezeigt, dass die chemische Hemmung oder der Knockdown von CYP1A die Toxizität in der Embryonalentwicklung vermindert (Cantrell et al., 1996; Dong et al., 2002) oder zumindest unverändert bleibt (Carney et al., 2004). Auf der anderen Seite beobachteten Billiard et al. (2006) einen Anstieg von PAH-induzierten Effekten in Embryonen des Zebrafisch, bei denen vorübergehend die Expression von CYP1A unterdrückt wurde und unterstützt die Hypothese, dass CYP1A eine adaptive Antwort ist und den sich entwickelnden Wirbeltierembryo eher schützt. Eine schützende Rolle wurde auch von Mattingly and Toscano (2001) postuliert, die das CYP1A-Protein und deren Aktivität in 72 h alten Embryonen nicht nachweisen konnten und auf *Post-translational Silencing* der CYP1A-Expression zum Schutz des sich entwickelnden Embryos vor der metabolischen Aktivierung von CYP1A nach der Exposition mit AhR-Liganden schlossen. Allerdings zeigten jüngere Studien, dass die Cytochrome P450-Aktivität in bereits 8 h alten Embryonen des Zebrafisch zu detektieren war (Jönsson et al., 2007a; Otte et al., 2010). Auch die vorliegende Studie zeigt in 72 h alten Embryonen eine deutliche CYP1A-Aktivität und weist eher auf eine schützende Rolle von CYP1A hin, da die gleichzeitige Exposition gegenüber Chlorpyrifos und  $\beta$ -Naphthoflavon zu

einer erhöhten Toxizität führte und mit abnehmender CYP1A-Aktivität korrelierte. Allerdings kann die Studie nur Hinweise liefern und es müssten noch einige Folgeuntersuchungen durchgeführt werden, um die tatsächliche Rolle von CYP1A in den frühen Entwicklungsstadien des Zebrafischembryos vollständig zu verstehen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis nach einer Exposition mit Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon liefert die Tatsache, dass die EROD-Induktion in 72 h alten Embryonen unabhängig vom Expositionsszenario und der Toxizitätskonzentration nicht komplett gehemmt werden konnte und deutet auf eine Stabilität der CYP1A-Aktivität in diesem Stadium hin. Wie bereits oben beschrieben, erreicht die Leber ihre volle Funktionalität im Alter von 72 h und der Embryo bereitet sich auf den Schlupf vor. Verschiedene Studien haben eine mehrfache Erhöhung der basalen Expression von CYP1A in diesem Entwicklungsstadium der Zebrafischembryonen (Bräunig et al., 2015; Jönsson et al., 2007b) und der Zahnkarpfinge (Binder and Stegeman, 1984; Wang et al., 2006) beschrieben.

Ein Vergleich zwischen den 3 h Kurzzeit-Expositionen bei 72 und 96 h alten Embryonen, bestätigen den unterschiedlichen CYP1A-Gehalt in den einzelnen Entwicklungsstadien. Eine identische Expositionsdauer von 3 h führten in 72 h alten Embryonen zu einer geringeren Hemmung der  $\beta$ -Naphthoflavon-Aktivität als bei 96 h alten Embryonen, bei denen eine vollständige Hemmung beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CYP1A kurz nach dem Schlüpfen eine entscheidende Rolle spielt, da der CYP1A-Gehalt nach 72 h so hoch ist, dass unabhängig von der Chlorpyrifos-Konzentration oder der Expositionszeit die EROD-Aktivität induziert wird.

Die Konzentration jedenfalls an sich kann nicht der Hauptgrund für das stetige Signal bei 72 h alten Embryonen sein, da die EROD-Aktivitäten in späteren Entwicklungsstadien nach Kurzzeitbelastung kontinuierlich abnahm. Wahrscheinlicher ist, dass die Toxikokinetik bzw. das Expositionsszenario eine entscheidende Rolle spielt. Wie oben diskutiert, intensiviert sich die Exposition der Xenobiotika mit dem Schlupf über eine gesteigerte Expositionsfläche des vorderen Darmtrakts und der Kiemen. Hinzu kommt, dass bei einer Standardtemperatur von 27 °C der Zeitpunkt des Schlupfes über den gesamten dritten Entwicklungstag stattfinden kann (Kimmel et al., 1995), sodass eine beträchtliche Variabilität in diesem Entwicklungsstadium gegeben ist und die einzelnen Analysen sehr variieren können.

Im Allgemeinen zeigte allerdings die Quantifizierung der *In vivo*-EROD-assoziierten Fluoreszenz, dass alle Embryonen, die Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon gemeinsam ausgesetzt waren, unabhängig von Konzentration und Entwicklungsstadium, signifikant geringere EROD-Aktivitäten aufwiesen als nach isolierter Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon (vgl. Abb. 29). Wheelock et al. (2005) bestätigte diese Beobachtungen durch Untersuchungen mit juvenilem Chinook-Lachs (*Oncorhynchus tshawytscha*), bei denen die CYP1A-Proteinspiegel bereits nach einer Exposition von 7,8  $\mu\text{g/L}$  Chlorpyrifos um ca. 30 % unterdrückt wurde (quantifiziert durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie).

Generell sind die densitometrischen Analysen im Einklang mit der rein optischen Bildanalyse. Die 120 h alten Embryonen zeigten nach einer 3 h Kurzzeit-Exposition von Chlorpyrifos +  $\beta$ -Naphthoflavon in den höheren Konzentrationen (0,5 und 1 mg/L) eine signifikant niedrigere Fluoreszenzintensität als nach einer isolierten Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon. Ebenso

spiegelt die densitometrische Analyse die Unsicherheit über eine Schwächung des Signals nach einer 3 h Kurzzeit-Exposition wider. Folglich führte die 3 h Kurzzeit-Exposition sowohl bei 72 als auch bei 96 h alten Embryonen zu stärkeren Fluoreszenzintensitäten als die kontinuierliche Exposition. Insbesondere zeigt die densitometrische Analyse, dass niedrige Konzentrationen (0,25 mg/L) in Kombination mit jungen Embryonen (72 und 96 h) ein Expositionsszenario zu sein scheint, das weniger empfindlich ist, um eine EROD-Hemmung in einer Art „Schnelltest“ zu erkennen.

### **Bisphenol A**

Der Text des folgenden Abschnitts: „*Bisphenol A*“ stammt aus dem Abschlussbericht des Gemeinschaftsprojektes DanTox (BMBF FKZ 02WU1054): „*DanTox - Entwicklung und Anwendung eines Verfahrens zur Ermittlung spezifischer Toxizität und molekularer Wirkungsmechanismen sedimentgebundener Umweltschadstoffe mit dem Zebrafisch (Danio rerio)*“, 318 S und wurde im Original von mir geschrieben:

„Bisphenol A induzierte in keiner getesteten Konzentration sowohl als Monosubstanz als auch in Kombination mit  $\beta$ -Naphthoflavon (10  $\mu$ g/L) keine EROD-Aktivität und ist auch kein Inhibitor. Diese Ergebnisse stehen in Gegensatz zu Jeong et al. (2000), der Bisphenol A als Inhibitor von CYP1A in Hepatocyten von Säugern beschrieb. Dies verdeutlicht an dieser Stelle noch einmal die Unterschiede zwischen dem CYP1A der Fische und dem CYP1A1 der Säuger.“

### **Aroclor 1254**

Der Text des Abschnitts: „*Aroclor 1254*“ basiert auf der Publikation: Kais et al. 2018, „*Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (Danio rerio) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A*“ Sci Total Environ; 615: 330-347 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Da die Induktion von Cytochrom P450 in Fischen nach einer Exposition gegenüber Aroclor 1254 wiederholt beschrieben wurden (siehe Review von Goksoyr, 1995), war die fehlende EROD-Aktivität von Aroclor 1254 durchaus unerwartet. Aroclor 1254, ein Modell-PCB-Gemisch, enthält mehr als 60 bis 80 PCB-Kongenere in analytisch nachweisbaren Mengen (Bedard et al., 1987). Im Allgemeinen können die PCB-Kongenere in nicht-*ortho*-PCBs, die eine koplanare Konfiguration aufweisen, und in *ortho*-substituierte PCBs mit einer nicht-koplanaren Konfiguration, eingeteilt werden (Al-Salman and Plant, 2012). Die koplanaren PCBs erzeugen toxische Wirkungen ähnlich denen von TCDD und werden als dioxinähnliche PCBs bezeichnet. Die nicht-koplanaren PCBs tragen *ortho*-Chlor-Substituenten am Biphenylring, was eine einfache planare Konfiguration verhindert und die Affinität zum Ah-Rezeptor signifikant reduziert (Al-Salman and Plant, 2012). Die nicht-koplanaren Verbindungen dominieren in den industriellen PCB-Mischungen (Ballschmiter and Zell, 1980). Aroclor 1254 besteht zu mehr als 50 % aus di-*ortho*-substituierten Kongeneren (Giesy and Kannan, 1998; Schulz et al., 1989).

Neben der reduzierten Affinität zum Ah-Rezeptor zeigten Suh et al. (2003), dass di-*ortho*-substituierten PCBs eher inhibitorische Wirkmechanismen der AhR-vermittelten Aktivierung in murinen Zelllinien aufwiesen. Sie analysierten die antagonistische Aktivität der CYP1A-Induktoren mehrerer di-*ortho*-substituierter PCB-Kongenere in Kombination mit starken AhR-

Agonisten wie 2,3,7,8-TCDD. Im Gegensatz zu den nicht-*ortho*-substituierten Kongeneren (planaren), die additive Effekte auf die CYP1A1-Induktion in Kombination mit TCDD hervorriefen, produzierten alle di-*ortho*-substituierten PCBs antagonistische Wirkmechanismen. Die molekularen Wirkmechanismen, die diesem Antagonismus zugrunde liegen, sind derzeit allerdings noch unbekannt.

Bannister et al. (1987) führt die antagonistische Aktivität von Aroclor 1254 auf eine nichtlineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zurück und berichtet, dass Aroclor 1254 eine 20 - 30 % ige Hemmung der TCDD-induzierten EROD-Aktivität im Rattenhepatom und Mäusen erzeugte, wenn submaximale Konzentrationen von TCDD verabreicht wurden. Nach Bannister et al. (1987) wird die teilweise antagonistische Aktivität von Aroclor 1254 erst mit höheren Spiegeln des Agonisten TCDD weniger wirksam. Eine erhöhte TCDD-Dosis kompensiert somit zumindest einen Teil des Antagonismus, der durch Aroclor 1254 hervorgerufen wurde. Demnach stellt Bannister et al. (1987) die Hypothese auf, dass die antagonistische Aktivität von Aroclor 1254 mit der kompetitiven Hemmung der TCDD-Bindung an dem Ah-Rezeptor zusammenhängt und nicht auf Zelltoxizität durch Aroclor 1254 zurückzuführen sei. Im Gegensatz dazu erzeugt die Verwendung hoher Dosen der Agonisten wie  $\beta$ -Naphthoflavon, Benzo[*a*]pyren oder planaren PCBs, eine Hemmung der Aktivität oder Verringerung der mRNA des induzierten CYP1A Proteins in Fischen (Goddard et al., 1987; Gooch et al., 1989; Haasch et al., 1993; Melancon and Lech, 1983).

Diese Schlussfolgerung stimmt mit unseren Beobachtungen überein, da Aroclor 1254 allein sowie auch in der Koexposition mit dem Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon in niedriger Konzentration nach 96 und 120 h zu einer deutlichen Abnahme der EROD-Aktivität führte. Diese Beobachtung konnte durch die densitometrische Analyse bestätigt werden, die in den höheren Konzentrationen (1-3 mg/L) nach 96 und 120 h zu einer signifikanten Abnahme der EROD-Aktivität führte. Auffällig war, dass die reduzierte EROD Aktivität nur in den älteren Stadien signifikant war und würde mit den Ergebnissen von Troxel et al. (1997a) gut übereinstimmen, die in der adulten Leber der Zebrabärblinge sowohl nach ernährungsbedingter Exposition, als auch nach intraperitonealer Verabreichung von Aroclor 1254, ein Mangel an induziertem CYP1A feststellten. Allerdings zeigte die 3 h-Kurzzeit-Exposition, dass nicht das Alter bzw. das Entwicklungsstadium per se die entscheidende Rolle spielte. Während die kontinuierliche Exposition gegenüber 3 mg/L Aroclor 1254 eine zeitabhängige Verringerung der Signalintensität nach 96 und 120 h zeigte, war bei der 3 h-Kurzzeit-Exposition selbst in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien keine Abnahme der Signalstärke in 96 und 120 h alten Embryonen zu beobachten. So, wie bereits oben die verspätete Toxizität im FET von Aroclor 1254 aufgrund von toxikokinetischen Prozessen diskutiert wurde, sind vermutlich ähnliche Prozesse für die verspätete Inhibierung von CYP1A verantwortlich.

Aroclor 1254 ist ein voluminöses, lipophiles Molekül, das sich durch eine langsame Diffusionsgeschwindigkeit auszeichnet und zunehmend im Gewebe akkumuliert. Das Verhältnis zwischen der Konzentration der Prüfsubstanz im Versuchsfisch und der Konzentration im Versuchswasser wird in der Ökotoxikologie als Biokonzentrationsfaktor bezeichnet. Der Biokonzentrationsfaktor leitet sich nicht nur aus der Lipophilie (bzw.  $\log K_{ow}$ ) ab, sondern auch vom Grad der Chlorierung des PCBs (Fox et al., 1994). In der Umwelt akkumulieren PCB-Gemische mit tetra-, penta-, hexa- und heptachlorierten Isomeren am

stärksten (Bruggeman et al., 1984; Kodavanti et al., 2001; Shaw and Connell, 1982). Daher kann man davon ausgehen, dass Aroclor 1254 als Pentachlorbiphenylether mit zunehmender Zeit im Körper akkumuliert und zu einer erhöhten internen Konzentration führt. Diese hohe Bioakkumulation im Gewebe könnte eine Erklärung für den Rückgang der EROD-Aktivität nach einer kontinuierlichen Exposition > 72 h sein. Die fehlende Abnahme der EROD-Aktivität nach einer Kurzzeit-Exposition unterstützt die Annahme eines toxikokinetischen Mechanismus, da Aroclor 1254 die EROD-Aktivität innerhalb von 3 h nicht zu verringern mochte (vgl. Abb. 38 und Abb. 39 G-I).

Es werden mehrere plausible Mechanismen diskutiert, die zu einer Unterdrückung der CYP1A-Aktivität führen könnten, wie Hepatotoxizität, Veränderung in der Häm-Synthese des Cytochroms oder Inaktivierung des Suizidsubstrates (Gooch et al., 1989). Bis heute sind die molekularen Mechanismen, die solchen supprimierenden Effekten auf die EROD-Aktivität zugrunde liegen, unbekannt und müssten weiter erforscht werden. Die Untersuchung z.B. die Induzierbarkeit der mRNA und deren Expressionslevel von CYP1A, wäre ein weiteres interessantes Forschungsgebiet, um Fehlinterpretationen von toxischen Potentialen durch die Verwendung von CYP1A als Biomarker zur Überwachung der Exposition von Fischen gegenüber Umweltschadstoffen wie PCBs zu vermeiden.

## Chinolin

Der Text des Abschnitts: „*Chinolin*“ basiert auf der von mir betreuten Bachelorarbeit von Ellen Steudle (2012): „*Fischembryotoxizität und Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität von Chinolin im Zebrafisch (Danio rerio)*“ und wurde von mir umgeschrieben.

Trotz der coplanaren aromatischen Struktur von Chinolin scheint es kein Agonist des Ah-Rezeptors zu sein, da die Embryonen in keinem Entwicklungsstadium und bei keiner der ausgesuchten Konzentrationen (7,5, 12,5 und 20 mg/L) eine Induktion oder Hemmung der EROD-Aktivität zeigten. Eine *In vitro*-Studie mit RTL-W1-Zellen ergab ebenfalls keine Induktion von CYP1A nach einer Exposition gegenüber Chinolin (Hinger et al., 2011).

Ein Vergleich von Chinolin mit anderen bekannten CYP1A-Induktoren, wie TCDD, Benzo[*a*]pyrene und  $\beta$ -Naphthoflavon (Denison and Nagy, 2003) weisen einen deutlich höheren log  $K_{ow}$  als Chinolin (log  $K_{ow}$ : 2,03) auf. Jung et al. (2001) stellten eine Korrelation zwischen der Lipophilie von nitrierten polycyclischen Kohlenwasserstoffe (NPAKs; zu denen auch Chinolin zählt) und der EROD-Aktivität dar. Sie untersuchten NPAKs, wie Benzo[*h*]chinolin, Benzo[*c*]chinolin und Acridin, die sich in ihrer Strukturformel von Chinolin nur durch einen zusätzlichen Benzolring unterscheiden. Trotz des höheren log  $K_{ow}$  (3,4-3,5) sind sie im Vergleich zu den anderen getesteten PAKs der Studie von Jung et al. (2001) deutlich im niedrigeren Bereich und durchaus mit dem verwendeten Chinolin unserer Studie vergleichbar. Jung et al. (2001) analysierten die Unterschiede zwischen NPAKs und den strukturverwandten PAKs in Bezug auf ihre EROD-Aktivität in der Zelllinie PLHC-1 von Zahnkarpfen (*Poeciliopsis lucida*) und fanden heraus, je höher der log  $K_{ow}$  war, desto höher war die messbare EROD-Aktivität. Chinolin und chinolinähnliche Substanzen erfüllen somit, trotz ihrer planaren Struktur, aufgrund von chemischen, physikalischen und strukturellen Gegebenheiten nicht die optimale Voraussetzung für die Bindung an den Ah-Rezeptor.

## 2,3-Benzofuran

Der Text des Abschnitts: „2,3-Benzofuran“ basiert auf der von mir betreuten Bachelorarbeit von Katharina Heye (2012): „Die Wirkung von 2,3-Benzofuran auf Cytochrom P<sub>450</sub> 1A in der Embryonalentwicklung des Zebrafisch (Danio rerio)“ und wurde von mir umgeschrieben.

Auch bei 2,3-Benzofuran, dem zweiten getesteten planaren Heteroaromaten, kam es in keinem Entwicklungsstadium und bei keiner der ausgetesteten Konzentrationen (8,5, 19 und 26 mg/L) zu einer Induktion oder Hemmung der EROD-Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hinger et al. (2011), der mithilfe des *In vitro*-EROD-Assays eine EROD Induktion durch 2,3-Benzofuran in RTL-W1-Zellen nachweisen konnte. Auch Schirmer (2006) konnte aus dem Grundwasser extrahiertes 2,3-Benzofuran als *In vitro*-CYP-Induktor identifizieren, zweifelte allerdings dieses aufgrund seiner Größe und Struktur als klassischen Induktor, so wie sie bei Whyte et al. (2000) und Denison et al. (2002) beschrieben worden sind, auch gleich an.

Generell ist hier zu vermerken, dass es problematisch ist zwei Testsysteme, wie den *In vitro*- und *In vivo*-EROD-Assay, miteinander zu vergleichen. Bartram et al. (2012) konnte z.B. in der Leber und in der Kieme der Regenbogenforelle nach einer gleichen Expositionskonzentration von Propranolol eine sechsfach höhere EROD-Aktivität *in vitro* als *in vivo* nachweisen und verdeutlicht noch einmal die Verschiedenheit der Auswertung sowie der Testsysteme an sich.

Ein weiterer Aspekt für die Differenz der Ergebnisse von Schirmer zu unserer Studie ist, dass bei Schirmer, 2,3-Benzofuran nicht als Reinsubstanz, sondern als extrahierte Fraktion aus einer komplexen Grundwasserprobe untersucht worden ist und eine Verunreinigung bzw. Wechselwirkung mit Substanzenrückständen in der zu analysierenden Probe nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

### 4.2.4 Live-Imaging-EROD-Assay mit Sedimentextrakten

Der Text des Abschnitts: „Sedimente“ basiert auf der Publikation: Kais et al. 2017, „*In vivo* EROD assays with the zebrafish (*Danio rerio*) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity“ *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280 und wurde im Original von mir geschrieben und übersetzt.

Ein wichtiger Aspekt bei der Evaluierung und Modifizierung des Live-Imaging-EROD-Assays in der vorliegenden Studie war, die Anwendbarkeit auf komplexe Gemische, wie Sedimentextrakte zu überprüfen, um ihn letztendlich als Werkzeug zum Screening dioxinähnlicher Substanzen in Umweltproben nutzen zu können. Das hohe EROD Induktionspotential in allen drei Sedimentextrakten wurde durch chemische Analysen von insgesamt 40 PAKs bestätigt (Hafner et al., 2015). Insbesondere bei komplexen chemischen Gemischen, wie in der vorliegenden Studie verwendeten Sedimentextrakten, wird die EROD-Aktivität durch zahlreiche Parameter beeinflusst. Z.B. können AhR-Agonisten und CYP1A-Inhibitoren in PAK kontaminierten Umweltproben gleichzeitig vorkommen (Billiard et al., 2008). Die chemischen Analysen der drei Sedimentextrakte zeigten die Anwesenheit einiger bekannter AhR-Agonisten wie Benzo[*k*]fluoranthren, Benzo[*a*]pyren, Indeno[1,2,3-*cd*]pyren, Chrysen, Benz[*a*]anthracen, Benzo[*b+j*]fluoranthren und Pyren (Barron et al., 2004; Billiard et al., 2008; Incardona et al., 2011). Auf der anderen Seite wurden in allen drei Sedimenten Phenanthren und Fluoranthren nachgewiesen, die als Nicht-Induktoren oder sogar Inhibitoren

von CYP1A beschrieben wurden (Billiard et al., 2004; Billiard et al., 2008; Fleming and Di Giulio, 2011; Hawkins et al., 2002; Wolińska et al., 2011). Tatsächlich können die höchsten Konzentrationen für PAKs in den Extrakten des Veringkanals auf Phenanthren (218 mg/kg) und Fluoranthen (208,4 mg/kg) zurückgeführt werden. Für solche Gemische, die PAKs starker und schwacher Agonisten beinhalten, beschrieben Billiard et al. (2004) ein additives EROD-Induktionspotential, wohingegen Basu et al. (2001) für das gleichzeitige Auftreten von starken und schwachen Induktoren eher auf additive Wechselwirkungen hinwies. Synergistische Effekte auf dem AhR-Signalweg durch das gemeinsame Auftreten von Benzo[*a*]pyren (einem CYP1A-Induktor) und Fluoranthen (einem CYP1A-Inhibitor) wurden jedenfalls bereits in mehreren Studien dokumentiert (Billiard et al., 2008; Fleming and Di Giulio, 2011; Matson et al., 2008). Interessanterweise wurden all diese beschriebenen PAKs in den Sedimenten aus dem Veringkanal gefunden. Wassenberg and Di Giulio (2004) zeigten, dass Benzo[*a*]pyren und Fluoranthen in Gemischen toxischer sind als Einzelverbindungen. Die hohe Toxizität und der relativ schnelle Abfall des Fluoreszenzsignals nach einer Exposition mit dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal können auf solche synergistischen Effekte hinweisen. Während Billiard et al. (2004) und Hawkins et al. (2002) beschrieben, dass Phenanthren (ein Nicht-Induktor von CYP1A) die EROD-Induktion von starken Induktoren aus der Gruppe der PAKs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hemmen, zeigten hingegen die Embryonen der vorliegenden Studie nach der Exposition aller drei Sedimentextrakte eine deutliche EROD-Induktion.

### **Konzentrationsabhängige EROD-Aktivität**

Die Ergebnisse des Live-Imaging-EROD-Assays nach einer kontinuierlichen Exposition gegenüber dem Sedimentextrakt aus dem Veringkanal zeigten bei Konzentrationen > EC<sub>10</sub>-Wert eine deutliche Verringerung des EROD-Signals. In früheren Studien wurde eine ähnliche Abnahme der EROD-Aktivität sowohl *in vitro* (Haasch et al., 1993) als auch *in vivo* (Nacci et al., 1998; Noury et al., 2006) beschrieben. Für die Regenbogenforelle postulierten Haasch et al. (1993), dass  $\beta$ -Naphthoflavon in der Lage sein könnte, die Deethylierung von Ethoxyresorufin im EROD-Assay zu stören, indem es mit dem Substrat um die aktive Stelle von CYP1A konkurriert. Abgesehen von der direkten Wirkung der kompetitiven Hemmung auf das aktive Zentrum von CYP1A, könnte aber auch die hohe Konzentration der Agonisten an sich pathologische Veränderungen hervorrufen und/oder sowohl die Absorptionsraten von Ethoxyresorufin als auch die Ausscheidungsraten von Resorufin behindern (Nacci et al., 1998). Angesichts des hohen Gehalts an PAKs in den Proben aus dem Veringkanal, müssen die Konzentrationen der PAKs im Hinblick auf ihr Potential, die EROD-Aktivität entweder zu stimulieren oder zu unterdrücken, genauer betrachtet und berücksichtigt werden.

Tatsächlich unterstützen Daten von *In vitro*-Enzymaktivitätstests die Beobachtungen, dass toxische Werte von z.B. PCBs die EROD-Aktivität reduzieren können. Newsted et al. (1995) sowie Hahn et al. (1993) vermuteten eine Reduktion der CYP1A-Proteinsynthese über ein negatives Feedback-System. Dosis-Wirkungs-Beziehungen, hinter einer möglichen Hemmung bei höheren Konzentrationen, sind auch Gegenstand neuerer Forschungen. Heinrich et al. (2014) modifizierte den *In vitro*-EROD-Assay durch Normalisierung der EROD-Aktivität auf die metabolischen Fähigkeiten der Zellen. Informationen zur Cytotoxizität können somit parallel zu den EROD Daten dokumentiert werden und ermöglichen die Unterscheidung

zwischen der Inhibierung der EROD-Aktivität und der Cytotoxizität als mögliche Ursache für abnehmende EROD-Aktivitäten bei steigenden Konzentrationen. Heinrich et al. (2014) beobachtete eine ähnliche Abnahme der EROD Aktivität in RTL-W1-Zellen nach einer Exposition gegenüber  $\beta$ -Naphthoflavon und konnte aufgrund der unveränderten Vitalität der Zellen einen cytotoxischen Effekt ausschließen.

### 4.3 Acetylcholinesterase – Assay

#### 4.3.1 EC<sub>10</sub>-Ermittlung von Paraoxon-methyl

Wie in Abb. 43 dargestellt, konnten bei der EC<sub>10</sub>-Konzentration von Paraoxon-methyl nur im geringem Ausmaß eine physiologische Wirkung beobachtet werden. Die subletalen Effekte beschränkten sich auf leichte Verkrümmungen der Wirbelsäule und Krämpfe, die für eine Acetylcholinesterase-Hemmung induzierte hypertone Paralyse typisch sind (Behra et al., 2002). Im Gegensatz zu den makroskopisch nachweisbaren Endpunkten zeigte die Acetylcholinesterase-Aktivität bereits eine sehr deutliche Reduktion (vgl. Abb. 43). Die Ergebnisse bestätigen noch einmal, dass für eine toxikologische Analyse spezifischer Wirkmechanismen die Effekte bei höheren Konzentrationen als EC<sub>10</sub> nicht eindeutig als spezifische toxikologische Wirkung zu interpretieren sind.

#### 4.3.2 Acetylcholinesterase-Hemmung durch ausgewählte Monosubstanzen

Von den ausgewählten Monosubstanzen: Methylquecksilberchlorid, Chlorpyrifos, Aroclor 1254, Bisphenol A, 2,3-Benzofuran und Chinolin, ergab nur Chlorpyrifos eine deutliche Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität. Das Hemmpotential von Chlorpyrifos wurde ebenfalls von Yen et al. (2011) beschrieben. Sie exponierten die Embryonen des Zebraärbings in der Zeitspanne von 48 bis 120 h nach der Befruchtung und beobachteten eine Acetylcholinesterase-Hemmung von ca. 80 % bei einer Konzentration von 105  $\mu\text{g/L}$  Chlorpyrifos. Diese Ergebnisse sind deutlich sensitiver als in der vorliegenden Studie, in der die Hemmung der Acetylcholinesterase nur 66 % betrug bei einer Konzentration von 620  $\mu\text{g/L}$  Chlorpyrifos. Dies könnte auf einen früheren Beginn der Exposition zurückzuführen sein, der in dieser Studie spätestens 1 h nach der Befruchtung stattfand. Der hauptsächliche aktive Metabolit von Chlorpyrifos ist das Chlorpyrifos-Oxon, das durch die Metabolisierung von Cytochrom P4501A gebildet wird (Straus et al., 2000). In den frühen embryonalen Stadien ist Cytochrom P4501A hauptsächlich in der Leber lokalisiert, von der angenommen werden kann, dass sie erst nach der Vaskularisierung der Leber (s.o.) nach ca. 56 h ihre volle Funktionsfähigkeit erhält. Es deuten frühere Studien darauf hin, dass die Exposition von Embryonen in den ersten Stunden die Entwicklung der Leber deutlich beeinträchtigen können, was wiederum mit einer verringerten Sensitivität der leberbezogenen Endpunkte einhergehen würde (OECD, 2013). Tatsächlich induziert die Metabolisierung von Chlorpyrifos zu Chlorpyrifos-Oxon eine spezifische Feedback-Hemmung des CYP-Systems (Fukuto, 1990; Moralev and Rozengart, 2001; Tang et al., 2002), sodass die Produktionsrate der Oxone über CYP1A reguliert wird.

Nach dem besten Wissen der Autorin wurden 2,3-Benzofuran und Chinolin bisher nicht in Bezug auf die Acetylcholinesterase-Hemmung untersucht. Methylquecksilber hingegen wurde in ähnlichen Konzentrationen mit dem Mexikanischen Flohkrebs (*Hyallela azteca*) untersucht und bestätigt eine fehlende Wirkung auf die Acetylcholinesterase-Aktivität (Steevens and Benson, 1999).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieb Muthuvel et al. (2006) im Gehirn von Albinoratten eine Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität nach einer Aroclor 1254-Exposition. Diese wurde allerdings erst nach einer 30 tägigen Exposition gegenüber Aroclor 1254 beobachtet und lässt eher auf eine Zellschädigung durch PCB erzeugte toxische Sauerstoffradikale schließen, als auf eine spezifische Reaktion der Acetylcholinesterase. Zum einen muss beachtet werden, dass es sich bei Aroclor 1254, wie oben bereits erläutert, nicht um eine einheitliche Substanz handelt, sondern um ein Gemisch. Verschiedene Chargen von Aroclor 1254 können daher zu erheblichen Unterschieden in den Effekten führen. Zum anderen muss die hohe Lipophilie des technischen PCB Gemisches berücksichtigt werden, die die ersten toxischen Wirkungen erst nach dem Schlupf (nach 72 h) erkennen ließen, was vermuten lässt, dass Aroclor 1254 aufgrund seines lipophilen Charakters an dem Chorion haftet und nicht passieren kann (s.o.). Daraus resultiert, dass die Exposition gegenüber Aroclor 1254 im 72 h alten Embryo eher auf 24 h nach dem Schlupf reduziert ist und aufgrund der langsamen Diffusionsgeschwindigkeit die tatsächliche Bioverfügbarkeit deutlich niedriger ausfällt, sodass eine gesteigerte Akkumulation von Aroclor 1254 im Gewebe erst mit einer verlängerten Exposition sichtbar wird.

Bisher wurde Bisphenol A nicht im Zebraquariabärbling auf Auswirkungen auf die Acetylcholinesterase-Aktivität getestet. In Ratten, Mäusen und der Gewöhnlichen Seespinne (*Hyas araneus*) zeigt Bisphenol A nach 21 bzw. 35 Tagen Exposition eine Hemmung der Acetylcholinesterase im Hippocampus (Fan et al., 2013; Minier et al., 2008). Somit scheinen die Wirkungen von Bisphenol A auf cholinerge Neuronen von einer Langzeit-Exposition abhängig zu sein (Miyagawa et al., 2007). Nach kurzzeitiger Exposition wirkt Bisphenol A jedoch nicht direkt auf die Acetylcholinesterase-Aktivität.

### 4.3.3 Acetylcholinesterase-Assay mit Sedimentextrakten

Extrakte von Sedimentproben stellen, wie bereits oben erläutert, komplexe Mischungen einer breiten Palette von Chemikalien dar, was zu einer unvorhersehbaren Vielfalt von additiven, synergistischen, antagonistischen und/oder sogar potenzierenden Effekten führen kann.

Bisher haben nur wenige Studien die Acetylcholinesterase-Hemmung nach Exposition mit Sedimentextrakten oder nativen Sedimenten untersucht (De Domenico et al., 2013; Gorokhova et al., 2010; Jung et al., 2012; Schvezov and Amin, 2011). Obwohl aufgrund variierender Protokolle und der Verwendung verschiedener Modellorganismen schwer zu vergleichen, wiesen alle Studien eine Hemmung der Acetylcholinesterase in Sediment-assoziierten Testsystemen nach. Jung et al. (2012) erfasste über 12 unterschiedliche chemische Klassen, darunter PAKs und drei Einzelsubstanzen, allerdings geben sie keinen Konzentrationsfaktor während der Extraktion an. Gorokhova et al. (2010) sowie Schvezov and Amin (2011) setzten Flohkrebs (*Monoporeia affinis*) einheimischen Sedimenten aus, während De Domenico et al.

(2013) Wolfsbarsche (*Dicentrarchus labrax*) auf native Sedimente exponierte, die jedoch nur auf Metalle analysiert wurden.

Im Rahmen des DanTox-Projektes wurden in den drei Sedimentproben insgesamt 33 PAKs durch die chemische Analyse nachgewiesen; unter diesen wurden 6 PAKs in erhöhten Konzentrationen zwischen 70 und 300 mg/kg in dem Sediment aus dem Veringkanal detektiert (s. Tab. 2), Fluoranthen macht mit 208 mg/kg den höchsten Anteil aus und ist bekannt dafür, die Acetylcholinesterase-Aktivität zu beeinflussen (Jett et al., 1999; Rodrigues et al., 2013). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist es wahrscheinlich, dass die Verringerung der Acetylcholinesterase-Aktivität im Extrakt vom Veringkanal zumindest teilweise auf die erhöhten Konzentrationen von PAKs zurückzuführen sind. Jüngere Studien dokumentierten eine Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität nach PAK-Expositionen in einer Vielzahl von Modellorganismen (Jett et al., 1999; Kang and Fang, 1997; Oropesa et al., 2007; Rodrigues et al., 2013). Im Gegensatz dazu haben Kopecka-Pilarczyk and Correia (2011) sowie Tang et al. (2003) gezeigt, dass es nach einer Exposition gegenüber Phenanthren, Pyren und Fluoren zu keiner Acetylcholinesterase-Hemmung in der Goldbrasse (*Sparus aurata*) sowie auch nach einer Exposition gegenüber Benzo[*a*]pyren, Chrysen, Anthracen und Pentachlorphenol ebenfalls zu keiner Acetylcholinesterase-Hemmung in C6- bzw. SY5Y-Zelllinien führte. Es ist bisher nicht bekannt, wie PAKs mit der Acetylcholinesterase interagieren. Mögliche Mechanismen könnten eine Enzyminteraktion, eine reduzierte Genexpression oder eine direkte Beeinflussung der cholinergen Neuronen sein.

### **Dotierung des Sedimentextrakts aus dem Veringkanal mit Chlorpyrifos**

Verschiedene Komponenten in komplexen Umweltproben können die Wirkungen einzelner Substanzen leicht maskieren oder modulieren. Unter Annahme identischer Wirkungsweisen der neurotoxischen Komponente des Sedimentextraktes und von Chlorpyrifos als Monosubstanz, sollte die kombinierte Exposition zu additiven Effekten führen. Vergleicht man allerdings die Acetylcholinesterase-Hemmung durch Chlorpyrifos allein mit dem Kombinationsversuch Chlorpyrifos + dem Veringkanal-Extrakt, zeigte sich, dass die chemische Mischung keine additive Wirkung auf das inhibitorische Potenzial entwickelte, sondern auf dem Niveau von Chlorpyrifos blieb. Unter Annahme der Hemmwirkung der bereits analysierten PAKs (s.o.) unterscheiden sich diese Ergebnisse von denen von Jett et al. (1999), die eine Erhöhung des *In vitro*-Hemmpotenzials von Chlorpyrifos-Oxon in Gegenwart von Pyren, Benzo[*a*]pyren, Anthracen und Fluoranthen zeigten. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse ist davon auszugehen, dass Chlorpyrifos ein stärkerer Inhibitor ist als die PAKs in dem Sedimentextrakt und dass das Gleichgewicht der kompetitiven Hemmung mit Chlorpyrifos sich vermutlich schneller einstellt als das der PAKs. Zusammenfassend kann man sagen, dass Acetylcholinesterase-hemmende Substanzen oder Mischungen in dem Sediment bzw. Extrakt aus dem Veringkanal nachweisbar waren und es aber noch weiterführende Forschung benötigt, um den genauen Mechanismus der Acetylcholinesterase-Hemmung weiter zu untersuchen.

## SCHLUSSFOLGERUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Verwendung des Fischembryotests (FET) als zuverlässiges Testsystem und erlauben Rückschlüsse auf spezifische Toxizität, z. B. dioxinähnlicher Toxizität oder Neurotoxizität. Diese Arbeit stellt aber auch die Problematik von Testsystemen für Chemikalien mit unterschiedlichen Eigenschaften dar. Insbesondere Chemikalien mit einem hohen  $\log K_{ow}$  erfordern spezielle Aufmerksamkeit, da mit zunehmender Zeit die Diffusionsrate ab- und die Akkumulationsrate mit steigendem  $\log K_{ow}$  zunehmen kann.

Es konnte in mehreren Abschnitten verdeutlicht werden, dass die Ermittlung der  $EC_{10}$ -Werte unabdingbar ist, um den FET als ein leistungsfähiges Werkzeug zur Identifizierung spezifischer Toxizität zu verwenden. Nur die systematische Analyse verschiedener Konzentrationen im niedrigeren Bereich der Monosubstanzen sowie auch der Sedimentextrakte ermöglichte die Identifizierung von Mechanismen, die das Erkennen einer spezifischen Toxizität zuließen. Die Lipophilie erwies sich z.B. als ein entscheidender Parameter für die Anwendung des FETs. Eine Akkumulation von Substanzen mit einem hohen  $\log K_{ow}$  waren zum einen mit einer verzögerten und zum anderen mit zunehmender Expositionszeit mit einer gesteigerten Toxizität verbunden (z.B. Aroclor1254).

Des Weiteren zeigten semi-statische Testsysteme mit für 24 h vorinkubierten Wellplatten stabilere Konzentrationen und ermöglichten besser reproduzierbare Ergebnisse auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen im  $EC_{10}$ -Bereich für die Induktion von Stressreaktionen bereits ausreichend hoch waren. Dies bestätigt die Forderung spezifische Wirkmechanismen nur mit niedrigen Konzentrationen zu untersuchen. Hinzu kommt, dass niedrigere Konzentrationen, wie jene im  $EC_{10}$  Bereich eine deutlich höhere Umweltrelevanz aufweisen und die Wahrscheinlichkeit von falsch negativen Ergebnissen reduzieren, sodass die Akzeptanz des FETs für regulatorische Anwendungen letztendlich erhöht wird.

Die Beurteilung von teratogenen Effekten erfordert ebenfalls Untersuchungen bei geringen Konzentrationen der Testlösungen und die Verwendung zusätzlicher Endpunkte, z.B. Fehlbildungen von Chorda und Schwanz, von Kopf und Kiefer, die Bildung von Ödemen, Deformationen des Dottersacks und verzögerter Schlupf oder Wachstumsretardierung. Der Zebraärbling ist aufgrund seiner Transparenz, der wirtschaftlichen Haltungsverbedingungen, der hohen Fruchtbarkeit und der extrauterinen Entwicklung zu einem vielversprechenden Modellorganismus für Screening auf teratogene Effekte geworden. Die vorliegende Arbeit dokumentiert einerseits charakteristische subletale Effekte wie Ödeme oder gebogene Schwänze als Folge einer Schadstoffbelastung, andererseits verdeutlichen die Ergebnisse aber auch die Problematik, aus subletalen Effekten auf ursächliche Kontaminationen, z.B. in komplexen Umweltproben, zu schließen. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung müssten mit einer erweiterten Liste von Substanzen durchgeführt werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass wissenschaftliche Informationen in ausreichendem Maße für Screening-Programme zur Identifikation von gefährlichen Chemikalien z.B. auch in Sedimenten zur Verfügung gestellt werden können.

Im Hinblick auf die Teratogenität ist die Bioaktivierung von Testchemikalien über Cytochrom P 450 von zentraler Bedeutung. Die hier vorgestellte Kombinationsexposition bietet die Möglichkeit, die Rolle von CYP1A nicht nur in Bezug auf Entgiftungsreaktionen, sondern auch auf eine mögliche Bioaktivierung hin zu untersuchen. Wie am Beispiel einer gleichzeitigen Exposition gegenüber Chlorpyrifos und  $\beta$ -Naphthoflavon, die zu einer 40 %igen Steigerung der Toxizität gegenüber Chlorpyrifos als Monosubstanz führte, gezeigt werden konnte, bietet die Kombinationsexposition die Möglichkeit, das Zusammenwirken von additiven und inhibitorischen Wechselwirkungen abzubilden. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Studie lag daher auf der Visualisierung des EROD-induzierenden Potenzials ausgewählter CYP-Stimulatoren und/oder -Hemmer zur Charakterisierung der Korrelation zwischen Entwicklungsfehlbildungen und der CYP1A-Aktivität in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Embryonen des Zebrafischblings.

Die Auswertung des modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays zeigten in den 24 und 48 h alten Embryonen des Zebrafischblings kein Signal in der Leber, sondern ein helles Signal im Gehirn, Augen und Otolithen, das eher auf die Induktion anderer Isoformen von CYP während der Entwicklung der Augen und nicht auf CYP1A-abhängige Entgiftungsprozesse zurückzuführen sein dürfte. Mit einer funktionsfähigen Leber nach ca. 72 h zeigten die mit  $\beta$ -Naphthoflavon behandelten Embryonen dagegen ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Leber, das nach einer 96- und 120 h-Exposition mit einer dosisabhängigen Zunahme von gebildetem Resorufin im Gastrointestinaltrakt abgebildet wurde. Anhand dieser Ergebnisse scheinen 96 und 120 h alte Embryonen die geeignetsten Entwicklungsstadien zu sein, um die *In vivo*-EROD-Aktivität mithilfe des Live-Imaging-EROD-Assays zu ermitteln. Darüber hinaus führte eine Reduktion der Expositionszeit auf 3 h zu einem schnellen und einfach zu handhabenden Instrument der Risikobewertung und verbessert die Effizienz des modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist das gleichzeitige Vorkommen von Agonisten und Inhibitoren von CYP1A typisch für komplexe Umweltgemische und erfordert Modifikationen des Live-Imaging-EROD-Assays. Daher wurden die Embryonen zum einen mit den Monosubstanzen und zum anderen parallel mit den binären Mischungen mit dem AhR-Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon exponiert. Nach bestem Wissen der Autorin stellt diese aktuelle Studie den ersten *In vivo*-Ansatz dar, um die Hemmung von CYP1A im Zebrafischblingsembryo sichtbar zu machen und die mögliche Rolle der CYP1A-Hemmung in Bezug auf die Toxizität zu untersuchen. Diese Kombinationsexposition mit dem Zebrafischbling spiegelt die Art der Wechselwirkung zwischen AhR-Induktor und CYP1A-Inhibitor wider. Es berücksichtigt die Komplexität von Umweltgemischen und reduziert die Wahrscheinlichkeit, das embryotoxische Potenzial zu unterschätzen. In Bezug auf eine inhibierte EROD-Aktivität innerhalb von 3 h zeigte sich, dass eine Kurzzeitexposition mit 72 h alten Embryonen nicht ausreichend war, um eine Hemmung der EROD-Aktivität darzustellen. Um den Live-Imaging-EROD-Assay als eine Art „Schnelltest“ zu verwenden, stellen die 96 und 120 h alten Embryonen die am besten geeigneten Entwicklungsstadien dar. Letztendlich ermöglichte die Bildauswertungssoftware eine Quantifizierung mit einer anschließenden statistischen Auswertung der EROD-Induktion. Dies führt zu einer besseren Vergleichbarkeit und trägt zu einer erhöhten Akzeptanz des modifizierten Live-Imaging-EROD-Assays bei.

Aufgrund der beobachteten charakteristischen Krämpfe in den Embryonen des Zebrafischlings nach einer Exposition gegenüber Chlorpyrifos, Aroclor 1254 oder Methylquecksilberchlorid wurde die Neurotoxizität mittels des Acetylcholinesterase -Assays überprüft. Der modifizierte AChE-Assay mit den Embryonen des Zebrafischlings erwies sich nach entsprechender Anpassung als ein geeignetes Werkzeug zum Nachweis von neurotoxischen Wirkungen, nicht nur von einzelnen Substanzen, sondern auch von komplexen Mischungen in frühen Entwicklungsstadien. Die vorliegende Studie belegt, dass PAKs in komplexen Umweltproben zumindest zur AChE-Hemmung beitragen können. Da jedoch die Kombinationsexposition mit dem Sedimentextrakt vom Veringkanal plus Chlorpyrifos keinen additiven hemmenden Effekt ergab, muss man davon ausgehen, dass die Wirkungsweise der AChE-Hemmung durch die sedimentgebundenen PAKs anders als die typische beobachtete AChE-Hemmung von Chlorpyrifos verläuft.

Auch wenn die beobachteten Krämpfe nach einer Exposition gegenüber Aroclor 1254 oder Methylquecksilber nicht auf eine inhibierte Acetylcholinesterase zurückzuführen sind, dokumentiert die vorliegende Arbeit, dass die Embryonen des Zebrafischlings ein geeignetes Modell zur Untersuchung ausgewählter Mechanismen neurotoxischer Wirkungen darstellen können.

Letztendlich kann die vorliegende Studie einen kleinen Teil dazu beitragen, allgemeine Zweifel an der Verwendung des FETs zu beseitigen. So konnte die Annahme der begrenzten Biotransformationskapazitäten in den frühen Lebensstadien bei den Embryonen des Zebrafischlings relativiert werden. Auch die Vermutung, dass der Zugang zum Embryo für lipophile Substanzen aufgrund der schützenden Rolle des Chorions eingeschränkt wäre, wurde zumindest durch die Verlängerung der Testdauer auf 96 bzw. 120 h, also über den Schlupf hinaus, kompensiert.

Obwohl noch eine Reihe von Fragen geklärt werden müsste, ist der Fischembryotest mit dem Zebrafischling (*Danio rerio*) ein äußerst zuverlässiges Instrument, um von Chemikalien ausgehende Gefahren für Vertebraten zu erkennen und vorherzusagen. Insgesamt ist der FET bereits so gut evaluiert und etabliert, dass er den akuten Fischtest ersetzen können sollte.

## LITERATUR

- 67/548/EWG. Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe vom 27. Juni 1967 (EG-Amtsblatt Nr. L 196 S. 1)  
[http://www.reach-clp-helpdesk.de/de/Downloads/CLP\\_Kompendium/RL\\_67\\_548\\_EWG.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.reach-clp-helpdesk.de/de/Downloads/CLP_Kompendium/RL_67_548_EWG.pdf?__blob=publicationFile&v=2), 1967.
- 1999/45/EG. RICHTLINIE 1999/45/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 31. Mai 1999 (EG-Amtsblatt Nr. L 200 S. 1) zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Zubereitungen.  
[https://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/Downloads/CLP\\_Kompendium/RL\\_1999\\_45\\_EG.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/Downloads/CLP_Kompendium/RL_1999_45_EG.pdf?__blob=publicationFile), 1999.
- Ahlf W. Biotests an Sedimenten. In: Steinberg C, Bernhardt H, Klappner H, editors. Handbuch Angewandte Limnologie - Teil Aquatische Ökotoxikologie. Ecomed, Landsberg, 1995, pp. 1-43.
- Al-Salman F, Plant N. Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 263: 7-13.
- Alderton W, Berghmans S, Butler P, Chassaing H, Fleming A, Golder Z, et al. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica* 2010; 40: 547-557.
- Alvares AP, Bickers DR, Kappas A. Polychlorinated biphenyls: a new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 1321-1325.
- Arufe MI, Arellano JM, García L, Albendín G, Sarasquete C. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. *Aquat Toxicol* 2007; 84: 328-336.
- Arzuaga X, Wassenberg D, Di Giulio R, Elskus A. The chlorinated AHR ligand 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes reactive oxygen species (ROS) production during embryonic development in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat Toxicol* 2006; 76: 13-23.
- ATSDR. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR 2,3-BENZOFURAN Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp25.pdf>, 1992.
- Bachmann J. Entwicklung und Erprobung eines Teratogenitäts-Screening Testes mit Embryonen des Zebrafischlings *Danio rerio*. Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften. Dr. rer. nat. Technischen Universität Dresden, Dresden. 2002, 249 pp.
- Ballschmiter K, Zell M. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius' anal Chem* 1980; 302: 20-31.
- Bannister R, Davis D, Zacharewski T, Tizard I, Safe S. Aroclor 1254 as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin antagonist: effects on enzyme induction and immunotoxicity. *Toxicology* 1987; 46: 29-42.
- Barron MG, Woodburn KB. Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol* 1995; 144: 1-93.
- Barron MG, Heintz R, Rice SD. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res* 2004; 58: 95-100.
- Bartram AE, Winter MJ, Huggett DB, McCormack P, Constantine LA, Hetheridge MJ, et al. *In vivo* and *in vitro* liver and gill EROD activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to the beta-blocker propranolol. *Environ Toxicol* 2012; 27: 573-582.

- Basu N, Billiard S, Fragoso N, Omoike A, Tabash S, Brown S, et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in trout exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 2001; 20: 1244-1251.
- Bedard DL, Wagner RE, Brennan MJ, Haberl ML, Brown JF, Jr. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 1094-1102.
- Behra M, Etard C, Cousin X, Strähle U. The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of acetylcholine esterase inhibitors. *Toxicol Sci* 2004; 77: 325-333.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* 2002; 5: 111-118.
- Belanger SE, Rawlings JM, Carr G. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem* 2013; 32: 1768-1783.
- Berghmans S, Butler P, Goldsmith P, Waldron G, Gardner I, Golder Z, et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function-potential safety screens for early drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008; 58: 59-68.
- Berry JP, Gantar M, Gibbs PD, Schmale MC. The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007; 145: 61-72.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, et al. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J Biol Chem* 2001; 276: 464-74.
- Billiard SM, Bols NC, Hodson PV. *In vitro* and *in vivo* comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004; 59: 292-299.
- Billiard SM, Timme-Laragy AR, Wassenberg DM, Cockman C, Di Giulio RT. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol Sci* 2006; 92: 526-536.
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 2008; 105: 5-23.
- Binder RL, Stegeman JJ. Microsomal electron transport and xenobiotic monooxygenase activities during the embryotic period of development in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 432-443.
- Bodewein L, Schmelter F, Di Fiore S, Hollert H, Fischer R, Fenske M. Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebrafish embryos and cancer cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016; 305: 83-92.
- Bonsignorio D, Perego L, Del Giacco L, Cotelli F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote* 1996; 4: 101-108.
- Brannen KC, Panzica-Kelly JM, Danberry TL, Augustine-Rauch KA. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2010; 89: 66-77.
- Brauer H. Handbook of environmental protection and environmental protection techniques. Vol 1: Emissions and effects (in German). Heidelberg: Springer Publ., 2012.
- Braunbeck T. Umweltcytologie – zelluläre Reaktionen zum Nachweis einer Schadstoffbelastung von Organismen. *Ruperto Carola* 1992; 85: 61-85.
- Braunbeck T. Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. *Veröff PAÖ* 1994; 8: 533-558.

- Braunbeck T. Cytological alterations in fish hepatocytes - *in vivo* and *in vitro* biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds.) Fish ecotoxicology. Experientia, Suppl Ser Birkhäuser, Basel 1998.
- Braunbeck T, Lammer E, Leist E, Rudolf M. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the zebrafish (*Danio rerio*) embryo toxicity test – an update. ALTEX 2005; 22, 87-102.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P. Fish populations under stress - the example of the Lower Neckar River. UWSF - Z. Umweltchem Ökotox 2009; 21: 197-211.
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. Environ Sci Pollut Res. 2015; 22: 16247–16261.
- Bräunig J, Schiwy S, Broedel O, Müller Y, Frohme M, Hollert H, et al. Time-dependent expression and activity of cytochrome P450 1s in early life-stages of the zebrafish (*Danio rerio*). Environ Sci Pollut Res 2015; 22, 16319-16328.
- Brown DR, Clark BW, Garner LV, Di Giulio RT. Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. Environ Sci Pollut Res 2015; 22: 8329-8338.
- Bruggeman WA, Opperhuizen A, Wijnbenga A, Hutzinger O. Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. Toxicol Environ Chem 1984; 7: 173-189.
- Busch W, Duis K, Fenske M, Maack G, Legler J, Padilla S, et al. The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2 - 3, 2010, Karlsruhe, Germany. Reprod Toxicol 2011; 31: 585-588.
- Busquet F, Strecker R, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T, Carr GJ, et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. Reg Tox Pharm 2014; 69: 496-511.
- Cantrell SM, Lutz LH, Tillitt DE, Hannink M. Embryotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*). Toxicol Appl Pharmacol 1996; 141: 23-34.
- Carney MW, Erwin K, Hardman R, Yuen B, Volz DC, Hinton DE, et al. Differential developmental toxicity of naphthoic acid isomers in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. Mar Pollut Bull 2008; 57: 255-266.
- Carney SA, Peterson RE, Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. Mol Pharmacol 2004; 66: 512-521.
- Carney SA, Prasch AL, Heideman W, Peterson RE. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2006; 76: 7-18.
- Chen C, Wang Y, Zhao X, Wang Q, Qian Y. The combined toxicity assessment of carp (*Cyprinus carpio*) acetylcholinesterase activity by binary mixtures of chlorpyrifos and four other insecticides. Ecotoxicology 2014; 23: 221-228.
- Choudhary D, Jansson I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 in ontogeny: evolving perspective. Drug Metab Rev 2004; 36: 549-568.
- Choudhary D, Jansson I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Physiological significance and expression of P450s in the developing eye. Drug Metab Rev 2006; 38: 337-352.
- Collin G, Höke H. Quinoline and Isoquinoline, IN: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim. 2005.
- Crinnion WJ. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. Altern Med Rev 2011; 16: 5-13.

- Dave G. Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Bull Environ Contam Toxicol 1984; 33: 621-630.
- Dave G, Xiu RQ. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch Environ Contam Toxicol 1991; 21: 126-134.
- De Domenico E, Mauceri A, Giordano D, Maisano M, Giannetto A, Parrino V, Natalotto A, D'Agata A, Cappello T, Fasulo S. Biological responses of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to contaminated sediments. Ecotox Environ Saf 2013; 97: 114-123.
- Dembélé K, Haubruge E, Gaspar C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicol Environ Saf 2000; 45: 49-54.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003; 43: 309-334.
- Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah-receptor. Chem Biol Interact 2002; 141: 3-24.
- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, Stegeman JJ, Peterson RE, Hiraga T. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. Toxicol Sci 2002; 69: 191-201.
- Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, Elger M, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Stemple DL, Zwartkruis F, Rangini Z, Driever W, Fishman MC. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. Development 1998; 125: 4655-4667.
- Easter SS, Jr., Nicola GN. The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). Dev Biol 1996; 180: 646-663.
- ECETOC. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances. ECETOC Monograph No 26, Brussels. 1996.
- ECHA. The use of alternatives to testing on animals for the REACH regulation. ECHA-11-R-004.2-EN 2012: 69 pages.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88-95.
- EPA U. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. US Environmental Agency, Washington, DC. Unpublished report dated 15 December 2007. 2007.
- EPA US. ECOTOX Database. Published by the United States environmental Protection Agency under <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>. 2002.
- Erdinger L, Dorr I, Durr M, Hopker KA. Analysis of mutagenic activity of airborne particulate matter, standard reference materials and reference compounds using base pair-specific *Salmonella typhimurium* tester strains. Mutat Res 2004; 564: 149-157.
- Ericson Jogsten I, Hagberg J, Lindstrom G, Bavel B. Analysis of POPs in human samples reveal a contribution of brominated dioxin of up to 15% of the total dioxin TEQ. Chemosphere 2010; 78: 113-120.
- EU. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. EU 2010; L 276: 33-79.
- Fan Y, Ding S, Ye X, Manyande A, He D, Zhao N, et al. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat? Horm Behav 2013; 64: 598-604.

- Feiler U, Ahlf W, Hoess S, Hollert H, Neumann-Hensel H, Meller M, et al. The SeKT joint research project: definition of reference conditions, control sediments and toxicity thresholds for limnic sediment contact tests. *Environ Sci Pollut Res Int* 2005; 12: 257-258.
- Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 477-488.
- Fent K. Schicksal von Umweltchemikalien im Organismus. (Kapitel 6, S. 157) In: Fent K. Ökotoxikologie. Umweltchemie – Toxikologie – Ökologie. 2. Thieme, Stuttgart, New York, 332 S. 2003.
- Fleming CR, Di Giulio RT. The role of CYP1A inhibition in the embryotoxic interactions between hypoxia and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH mixtures in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 2011; 20: 1300-1314.
- Förstner U. Umweltschutztechnik. 7th edn. Springer, Heidelberg, p 475
- Fox K, Zauke GP, Butte W. Kinetics of bioconcentration and clearance of 28 polychlorinated biphenyl congeners in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 1994; 28: 99-109.
- Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* 1990; 87: 245-254.
- Fulton MH, Key PB. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 2001; 20: 37-45.
- Gellert G, Heinrichsdorff J. Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater. *Water Res* 2001; 35: 3754-3757.
- GESTIS. Gefahrstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Institut für Arbeitsschutz. <https://www.dguv.de/ifa/gestis/gestis-stoffdatenbank/index.jsp> (abgerufen am 19.06.2018).
- Giddings JM, Williams WM, Solomon KR, Giesy JP. Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 2014; 231: 119-162.
- Giesy JP, Kannan K. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1998; 28: 511-569.
- Goddard KA, Schultz RJ, Stegeman JJ. Uptake, toxicity, and distribution of benzo[a]pyrene and monooxygenase induction in the topminnows *Poeciliopsis monacha* and *Poeciliopsis lucida*. *Drug Metab Dispos* 1987; 15: 449-455.
- Goksoyr A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 1995; 17: 80-95.
- Goldstone HM, Stegeman JJ. Molecular mechanisms of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin cardiovascular embryotoxicity. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 261-289.
- González-Doncel M, San Segundo L, Sastre S, Tarazona JV, Torija CF. Dynamics of BNF-induced *in vivo* ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity during embryonic development of medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 2011; 105: 421-427.
- Gooch JW, Elskus AA, Kloepper-Sams PJ, Hahn ME, Stegeman JJ. Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 98: 422-433.
- Görge G, Nagel R. Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotox Environ Saf* 1990; 20: 246-255.
- Gorokhova E, Löf M, Halldórsson HP, Tjärnlund U, Lindström M, Elfving T, et al. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquat Toxicol* 2010; 99: 263-274.

- Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006; 368: 2167-2178.
- Groshart P, Okkerman C, Pijnenburg A. Chemical study on Bisphenol A. Ministerie van Verkeer en Waterstaat. Den Haag, The Netherlands. 2001.
- Groth G, Kronauer K, Freundt KJ. Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol In Vitro* 1994; 8: 401-406.
- Groth G, Schreeb K, Herdt V, Freundt KJ. Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993; 50: 878-882.
- Guilhermino L, Celeste Lopes M, Carvalho AP, Soares AM. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 1996; 32: 727-738.
- Haasch ML, Quardokus EM, Sutherland LA, Goodrich MS, Lech JJ. Hepatic CYP1A1 induction in rainbow trout by continuous flow-through exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. *Fund Appl Toxicol* 1993; 20: 72-82.
- Hafner C, Gartiser S, Garcia-Kaufer M, Schiwy S, Hercher C, Meyer W, et al. Investigations on sediment toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22:16358-16370.
- Hahn ME, Lamb TM, Schultz ME, Smolowitz RM, Stegeman JJ. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquat Toxicol* 1993; 26: 185-208.
- Halder M, Léonard M, Iguchi T, Oris JT, Ryder K, Belanger SE, et al. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integr Environ Assess Man* 2010; 6: 484-491.
- Handley-Goldstone HM, Grow MW, Stegeman JJ. Cardiovascular gene expression profiles of dioxin exposure in zebrafish embryos. *Toxicol Sci* 2005; 85: 683-693.
- Hannemann EH. Diisopropylfluorophosphate inhibits acetylcholinesterase activity and disrupts somitogenesis in the zebrafish. *J Exp Zool* 1992; 263: 41-53.
- Hawkins SA, Billiard SM, Tabash SP, Brown RS, Hodson PV. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 2002; 21: 1845-1853.
- Heinrich P, Diehl U, Förster F, Braunbeck T. Improving the *in vitro* ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) assay with RTL-W1 by metabolic normalization and use of  $\beta$ -naphthoflavone as the reference substance. *Comp Biochem Physiol* 2014; 164C: 27-34.
- Helmstetter MF, Alden I, R.W. Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Aquatic Toxicology* 1995; 32: 1-13.
- Helmstetter MF, Maccubbin AE, Alden RW. The medaka embryo-larval assay: an *in vivo* assay for toxicity, teratogenicity, and carcinogenicity (93-124). In: Ostrander, G. (eds.), *Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC Press, 704 pp. 1996.
- Henn K, Braunbeck T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol* 2011; 153C: 91-98.
- Hentschel DM, Park KM, Cilenti L, Zervos AS, Drummond I, Bonventre JV. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F923-929.
- Herrmann K. Effects of the anticonvulsant drug valproic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicol In vitro* 1993; 7: 41-54.

- Hinger G, M. B, K. B, Sagner A, Takner H, Eisenträger A, et al. Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. *Environ Sci Pollut Res Int* 2011; 18: 1297-1304.
- Hollert H, Dürr M, Erdinger L, Braunbeck T. Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. *Environ Toxicol Chem* 2000; 19: 528-534.
- Hollert H, Heise S, Keiter S, Heininger P, Förstner U. Wasserrahmenrichtlinie - Fortschritte und Defizite. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 2007; 19: 58-70.
- Hollert H, Hudjetz S, Claus E, Manz W, Reifferscheid G, Heininger P, et al. Über die Notwendigkeit der wirkungsorientierten Analytik in einer umfassenden Wasserforschung. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 2009a; 21: 235-237.
- Hollert H, Bluhm K, Keiter S, Böttcher M, Grund S, Seitz N, et al. Eine Weight-of-Evidence-Studie zur Bewertung der Sedimentbelastung und des Fischrückgangs in der Oberen Donau. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 2009b; 21: 260-263.
- Hsieh DPH, McKone, T.E., Chiao, F., Currie, R.C., and Kleinschmidt, L. Final Draft Report: Intermedia transfer factors for contaminants found at hazardous waste sites. Prepared for the Office of Scientific Affairs, Department of Toxic Substances Control, California Environmental Protection Agency. 1994.
- Humphrey C, Klumpp DW. Toxicity of chlorpyrifos to the early life history stages of eastern rainbowfish *Melanotaenia splendida splendida* (Peters 1866) in tropical Australia. *Environ Toxicol* 2003; 18: 418-427.
- Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat Toxicol* 2006; 76: 69-92.
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196: 191-205.
- Incardona JP, Linbo TL, Scholz NL. Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 257: 242-249.
- Irmeler I, Schmidt K, Starck JM. Developmental variability during early embryonic development of zebra fish, *Danio rerio*. *Mol Dev Evol* 2004; 302B: 446-457.
- Jeffries MK, Stultz AE, Smith AW, Rawlings JM, Belanger SE, Oris JT. Alternative methods for toxicity assessments in fish: comparison of the fish embryo toxicity and the larval growth and survival tests in zebrafish and fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 2584-2594.
- Jeong HG, Kimand JY, Choi CY. Down-regulation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells by bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 594-598.
- Jett DA, Navoa RV, Lyons MA. Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity *in vitro*. *Toxicol Lett* 1999; 105: 223-229.
- Jin Y, Liu Z, Peng T, Fu Z. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immuno* 2015; 43: 405-414.
- Jones H. Xenobiotic metabolism and zebrafish (*Danio rerio*) larvae. PhD thesis. University of Birmingham, 2010.
- Jönsson ME, Jenny MJ, Woodin BR, Hahn ME, Stegeman JJ. Role of AHR2 in the expression of novel cytochrome P450 1 family genes, cell cycle genes, and morphological defects in developing zebrafish exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci* 2007a; 100: 180-193.

- Jönsson ME, Orrego R, Woodin BR, Goldstone JV, Stegeman JJ. Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007b; 221: 29-41.
- Jönsson ME, Franks DG, Woodin BR, Jenny MJ, Garrick RA, Behrendt L, et al. The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes *via* AHR2 in zebrafish. *Chem Biol Interact* 2009; 181: 447-454.
- Jung DKJ, Klaus T, Fent K. Cytochrome P450 by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environ Toxicol Chem* 2001; 20: 149-159.
- Jung JH, Hong SH, Yim UH, Ha SY, Shim WJ, Kannan N. Multiple *in vitro* bioassay approach in sediment toxicity evaluation: Masan Bay, Korea. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 89: 32-37.
- Kais B, Stengel D, Batel A, Braunbeck T. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environ Sci Pollut Res* 2015; 22: 16329-16339.
- Kais B, Ottermanns R, Scheller F, Braunbeck T. Modification and quantification of *in vivo* EROD live-imaging with zebrafish (*Danio rerio*) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A. *Sci Total Environ* 2018; 615: 330-347.
- Kais B, Schiwiy S, Hollert H, Keiter SH, Braunbeck T. In vivo EROD assays with the zebrafish (*Danio rerio*) as rapid screening tools for the detection of dioxin-like activity. *Sci Total Environ* 2017; 590-591: 269-280.
- Kais B, Schneider KE, Keiter S, Henn K, Ackermann C, Braunbeck T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion – Implications for the fish embryo test (FET). *Aquat Toxicol* 2013; 140-141: 229-238.
- Kammerbauer J, Moncada J. Pesticide residue assessment in three selected agricultural production systems in the Choluteca River Basin of Honduras. *Environ Poll* 1998; 103: 171-181.
- Kang JJ, Fang HW. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 238: 367-369.
- Karlsson J, Sundberg H, Åkerman G, Grunder K, Eklund B, Breitholtz M. Hazard identification of contaminated sites—ranking potential toxicity of organic sediment extracts in crustacean and fish. *J Soils Sed* 2008; 8: 263-274.
- Keiter S, Boettcher M, Grund S, Seitz N, Braunbeck T, Hollert H. Decrease in fish populations in the upper Danube River. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 2009; 21: 186-196.
- Keiter S, Peddinghaus S, Feiler U, von der Goltz B, Hafner C, Ho NY, et al. a BMBF joint project to identify specific. Sediment toxicity and molecular mechanisms of environmental pollutants with zebrafish (*Danio rerio*). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 2010a; 22: 94-98.
- Keiter S, Peddinghaus S, Feiler U, von der Goltz B, Hafner C, Ho NY, et al. DanTox-a novel joint research project using zebrafish (*Danio rerio*) to identify specific toxicity and molecular modes of action of sediment-bound pollutants. *J Soils Sed* 2010b; 10: 714-717.
- Kienle C, Köhler H-R, Gerhardt A. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72: 1740-1747.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203: 253-310.

- King-Heiden TC, Mehta V, Xiong KM, Lanham KA, Antkiewicz DS, Ganser A, et al. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 354: 121-138.
- Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, Würtz S, Behrends T, Hermelink B, et al. Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 187-200.
- Klüver N, König M, Ortmann J, Massei R, Paschke A, Kühne R, et al. Fish embryo toxicity test: identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. *Environ Sci Technol* 2015; 49: 7002-7011.
- Knöbel M, Busser FJM, Rico-Rico A, Kramer NI, Hermens JLM, Hafner C, et al. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 9690-9700.
- Kodavanti PR, Kannan N, Yamashita N, Derr-Yellin EC, Ward TR, Burgin DE, et al. Differential effects of two lots of aroclor 1254: congener-specific analysis and neurochemical end points. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 1153-1161.
- Kopecka-Pilarczyk J, Correia AD. Effects of exposure to PAHs on brain AChE in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., under laboratory conditions. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011; 86: 379-383.
- KORA. Ableitung von Geringfügigkeitsschwellenwerten für das Grundwasser, NSO-Heterozyklen. Erarbeitet vom Unterausschuss "Geringfügigkeitsschwellenwerte für NSO-Heterozyklen" des Ständigen Ausschusses „Grundwasser und Wasserversorgung“ der LAWA, [http://www.lawa.de/documents/Bericht\\_NSO\\_Heterozyklen\\_9f8.pdf](http://www.lawa.de/documents/Bericht_NSO_Heterozyklen_9f8.pdf), 2009/2010.
- Korzh S, Pan X, Garcia-Lecea M, Winata CL, Pan X, Wohland T, Korzh V, Gong Z. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Dev Biol* 2008; 8:84.
- Küster E. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquat Toxicol* 2005; 75: 76-85.
- Küster E, Altenburger R. Comparison of cholin- and carboxylesterase enzyme inhibition and visible effects in the zebra fish embryo bioassay under short-term paraoxon-methyl exposure. *Biomarkers* 2006; 11: 341-354.
- Küster E, Altenburger R. Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2007; 68: 751-760.
- Laale HW. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J Fish Biol* 1977; 10: 121-173.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol* 2009; 149C: 196-209.
- Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 1995; 30: 2087-2102.
- Le Bihanic F, Couillard CM, Rigaud C, Legare B. A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. *Mar Environ Res* 2013; 84: 17-23.
- Lee JW, Na DS, Chae SK, Kim C, Kang JY, Ju BK, et al. Using the chorions of fertilized zebrafish eggs as a biomaterial for the attachment and differentiation of mouse stem cells. *Langmuir* 2005; 21: 7615-7620.

- Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XH. *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano* 2007; 1: 133-143.
- Levin ED, Swain HA, Donerly S, Linney E. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol Teratol* 2004; 26: 719-723.
- Libby RT, Smith RS, Savinova OV, Zabaleta A, Martin JE, Gonzalez FJ, John SW. Modification of Ocular Defects in Mouse Developmental Glaucoma Models by Tyrosinase. *Science* 2003; 299: 1578-1581.
- Liu L, Fokkink R, Koelmans AA. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to polystyrene nanoplastic. *Environ Toxicol Chem* 2016; 35: 1650-1655.
- Maccubbin AE, Black JJ. Passive perchorionic carcinogen bioassay using Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) embryos, *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, Ninth Volume, ASTM STP 921, T.M. Poston and R. Purdy, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 277-286. 1986.
- Masiá A, Campo J, Navarro-Ortega A, Barceló D, Picó Y. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci Total Environ* 2015; 503-504: 58-68.
- Matson CW, Timme-Laragy AR, Di Giulio RT. Fluoranthene, but not benzo[*a*]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 2008; 74: 149-154.
- Mattingly CJ, Toscano WA. Posttranscriptional silencing of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Dev Dyn* 2001; 222: 645-654.
- Mayer P, Reichenberg F. Can highly hydrophobic organic substances cause aquatic baseline toxicity and can they contribute to mixture toxicity? *Environ Toxicol Chem* 2006; 25: 2639-2644.
- McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today* 2008; 13: 394-401.
- Melancon MJ, Lech JJ. Dose-effect relationship for induction of hepatic monooxygenase activity in rainbow trout and carp by Aroclor 1254. *Aquat Toxicol* 1983; 4: 51-61.
- Minier C, Forget-Leray J, Bjornstad A, Camus L. Multixenobiotic resistance, acetyl-choline esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyasaranus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate. *Mar Pollut Bull* 2008; 56: 1410-1415.
- Miyagawa K, Narita M, Narita M, Akama H, Suzuki T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol A. *Neurosci Lett* 2007; 418: 236-241.
- Monteiro M, Quintaneiro C, Morgado F, Soares AM, Guilhermino L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2005; 62: 341-347.
- Moralev SN, Rozengart EV. "Substrate inhibition" is one of the aspects of substrate specificity in vertebrate and invertebrate cholinesterases. *J Evol Biochem Phys* 2001; 37: 469-491.
- Mu J, Wang J, Jin F, Wang X, Hong H. Comparative embryotoxicity of phenanthrene and alkyl-phenanthrene to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Mar Poll Bull* 2014; 85: 505-515.
- Muthuvel R, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Gunadharini DN, Kanagaraj P, Jone Stanley A, et al. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clin Chim Acta* 2006; 365: 297-303.
- Mwila K, Burton MH, Van Dyk JS, Pletschke BI. The effect of mixtures of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and application of chemometrics to identify pesticides in mixtures. *Environ Monitor Assess* 2013; 185: 2315-2327.

- Nacci D, Coiro L, Kuhn A, Champlin D, Munns J, W., Specker J, et al. Nondestructive indicator of ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity in embryonic fish. *Environ Toxicol Chem* 1998; 17: 2481-2486.
- Nagel R. *DarT*: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*- a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002; 19: 38-48.
- Nagel R, Isberner C. Testing of chemicals with fish - a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. In: Braunbeck T, Streit B, Hinton DE, editors. *Fish ecotoxicology*. 86. Birkhäuser, Basel, 1998, pp. 337-352.
- Neal RA, Halpert J. Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 321-339.
- Nelson SM, Mahmoud T, Beaux M, 2nd, Shapiro P, McIlroy DN, Stenkamp DL. Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine* 2010; 6: 93-102.
- Netzband M, Stefanov WL, Redman CL. *Applied Remote Sensing for Urban Planning, Governance and Sustainability*. Springer, Heidelberg, 2007.
- Newsted JL, Jones PD, Giesy JP, Crawford RA, Ankley GT, Tillitt DE, et al. Development of toxic equivalency factors for PCB congeners and the assessment of TCDD and PCB mixtures in rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 1995; 14: 861-871.
- Noury P, Geffard O, Tutundjian R, Garric J. Non destructive *in vivo* measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. *Environ Toxicol* 2006; 21: 324-331.
- NTP. National Toxicology Program – technical report series no. 370. Toxicology and carcinogenesis studies of benzofuran (CAS No. 271-89-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. 1989.
- OECD. OECD guideline for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. OECD Test Guideline 203: Fish, Acute toxicity test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 1992.
- OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2000.
- OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2013.
- Olivares A, van Drooge BL, Casado M, Prats E, Serra M, van der Ven LT, et al. Developmental effects of aerosols and coal burning particles in zebrafish embryos. *Environ Poll* 2013; 178: 72-79.
- Oropesa AL, Perez-Lopez M, Hernandez D, Garcia JP, Fidalgo LE, Lopez-Beceiro A, et al. Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). *Sci Total Environ* 2007; 372: 528-532.
- Ostrach DJ, Low-Marchelli JM, Eder KJ, Whiteman SJ, Zinkl JG. Maternal transfer of xenobiotics and effects on larval striped bass in the San Francisco estuary. *Proc Nat Acad Sci* 2008; 105: 19354-19359.
- Otte JC, Schmidt AD, Hollert H, Braunbeck T. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2010; 100: 38-50.
- Pelka KE, Henn K, Keck A, Sapel B, Braunbeck T. Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol* 2017; 185: 1-10.
- Perez J, Domingues I, Monteiro M, Soares AM, Loureiro S. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 4671-4680.

- Perkins EJ, Schlenk D. *In vivo* acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. *Toxicol Sci* 2000; 53: 308-315.
- Perkow W, Ploss H. *Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, 3. Auflage, Berlin. 1999.
- Pickford DB, Hetheridge MJ, Caunter JE, Hall AT, Hutchinson TH. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 2003; 53: 223-235.
- Porta M, Zumeta E. Implementing the Stockholm Treaty on Persistent Organic Pollutants. *Occup Environ Med* 2002; 59: 651-652.
- Quilang JPDG, M. C.; de Hitta-Catalan, M. H.; Rubio, R. O.; Jacinto, S. D.; Santiago, E. C.; Cao, E. P. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on root meristem cells of common onion (*Allium cepa* L.) and on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Phil Science* 2008; 137: 141-151.
- Rammler DH, Zaffaroni A. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Ann NY Acad Sci* 1967; 141: 13-23.
- Ramos EU, Vermeer C, Vaes WHJ, Hermens JLM. Acute toxicity of polar narcotics to three aquatic species (*Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lymnaea stagnalis*) and its relation to hydrophobicity. *Chemosphere* 1998; 37: 633-650.
- Rand GM, Petrocelli SR. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.*, 1985.
- Rawson DW, Zhang T, Kalicharan D, Jongebloed WL. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research* 2000; 31: 325 - 336.
- Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health* 1995; 44: 135-165.
- Rodrigues AP, Lehtonen KK, Guilhermino L, Guimarães L. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: Accumulation and multibiomarker responses. *Sci Total Environ* 2013; 443: 454-463.
- Rovida C, Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals – a report by the transatlantic think tank for toxicology. *Altex* 2009; 26: 187-208.
- Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*: Methuen, London, 1959.
- Russom CL, LaLone CA, Villeneuve DL, Ankley GT. Development of an adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 2157-2169.
- Russom CL, Bradbury SP, Broderius SJ, Hammermeister DE, Drummond RA. Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 1997; 16: 948-967.
- Saili KS, Corvi MM, Weber DN, Patel AU, Das SR, Przybyla J, et al. Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 2012; 291: 83-92.
- Schirmer K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 2006; 224: 163-183.

- Schiwy S, Bräunig J, Alert H, Hoollert H, Keiter SH. A novel contact assay for testing aryl hydrocarbon receptor (AhR) -mediated toxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Pollut Res* 2015; 22: 16305-16318.
- Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res* 2008; 15: 394-404.
- Scholz S, Sela E, Blaha L, Braunbeck T, Galay-Burgos M, García-Franco M, et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013; 67: 506-530.
- Schulz DE, Petrick G, Duinker JC. Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environ Sci Technol* 1989; 23: 852-859.
- Schvezov N, Amin O. Biochemical response of amphipods (Gammarid: *Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotox Environ Saf* 2011; 74: 394-402.
- Segner H, Cravedi J-P. Metabolic activity in primary cultures of fish hepatocytes. *ATLA* 2001; 29: 251-257.
- Seiler TB, Schulze T, Hollert H. The risk of altering soil and sediment samples upon extract preparation for analytical and bio-analytical investigations – a review. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390: 1975-1985.
- Selderslaghs IWT, Blusb R, Witters HE. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod Toxicol* 2012; 33: 142-154.
- Selderslaghs IWT, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* 2009; 28: 308-332.
- Shaw G, Connell D. Factors influencing concentrations of polychlorinated biphenyls in organisms from an estuarine ecosystem. *Mar Freshw Res* 1982; 33: 1057-1070.
- Sklarew DS, Girvin DC. Attenuation of polychlorinated biphenyls in soils. *Rev Environ Contam Toxicol* 1987; 98: 1-41.
- Smital T, Terzic S, Loncar J, Senta I, Zaja R, Popovic M, et al. Prioritisation of organic contaminants in a river basin using chemical analyses and bioassays. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 1384-1395.
- Söffker M, Tyler CR. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish – a critical review on effects and possible consequences. *Crit Rev Toxicol* 2012; 42: 653-668.
- Steevens JA, Benson WH. Toxicological interactions of chlorpyrifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyaella azteca*. *Toxicol Sci* 1999; 52: 168-177.
- Stegeman JJ, Behrendt L, Woodin BR, Kubota A, Lemaire B, Pompon D, et al. Functional characterization of zebrafish cytochrome P450 1 family proteins expressed in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 2340-2352.
- Stengel D, Zindler F, Braunbeck T. An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp Biochem Physiol* 2017; 193C: 18-29.
- Stouthart AJHX, Spanings FAT, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* 1994; 30: 137-151.
- Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 2012; 33: 128-132.
- Straus DL, Schlenk D, Chambers JE. Hepatic microsomal desulfuration and dearylation of chlorpyrifos and parathion in fingerling channel catfish: lack of effect from Aroclor 1254. *Aquat Toxicol* 2000; 50: 1141-1149.

- Suh J, Kang JS, Yang K-H, Kaminski NE. Antagonism of aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of CYP1A1 and inhibition of IgM expression by di-*ortho*-substituted polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharm* 2003; 187: 11-21.
- Sultatos LG, Minor LD, Murphy SD. Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: role of the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 624-628.
- Sundberg H, Ishaq R, Åkerman G, Tjärnlund U, Zebühr Y, Linderöth M, et al. A Bio-Effect Directed Fractionation Study for Toxicological and Chemical Characterization of Organic Compounds in Bottom Sediment. *Toxicological Sciences* 2005; 84: 63-72.
- Tang J, Cao Y, Rose RL, Hodgson E. *In vitro* metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem Biol Interact* 2002; 141: 229-241.
- Tang Y, Donnelly KC, Tiffany-Castiglioni E, Mumtaz MM. Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures. *J Toxicol Environ Health* 2003; 66A: 919-940.
- Tanneberger K, Knobel M, Busser FJ, Sinnige TL, Hermens JL, Schirmer K. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 1110-1119.
- Teraoka H, Dong W, Hiraga T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenit Anom (Kyoto)* 2003; 43: 123-132.
- Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp Biochem Physiol* 2011; 153C: 9-16.
- Troxel CM, Buhler DR, Hendricks JD, Bailey GS. CYP1A induction by beta-naphthoflavone, Aroclor 1254, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and its influence on aflatoxin B1 metabolism and DNA adduction in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997a; 146: 69-78.
- Troxel CM, Reddy AP, O'Neal PE, Hendricks JD, Bailey GS. *In vivo* aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997b; 143: 213-220.
- Tse WK, Yeung BH, Wan HT, Wong CK. Early embryogenesis in zebrafish is affected by bisphenol A exposure. *Biol Open* 2013; 2: 466-471.
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 1998; 28: 319-361.
- UNEP-Chemicals. Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs., UNEP, 1999, pp. 40.
- Van den Bulck K, Hill A, Mesens N, Diekman H, De Schaepdrijver L, Lammens L. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring? *Reprod Toxicol* 2011; 32: 213-219.
- van Leeuwen CJ, Griffioen PS, Vergouw WHA, Maas-Diepeveen JL. Differences in susceptibility of early life stages of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat Toxicol* 1985; 7: 59-78.
- Walker CH, Sibly RM, Hopkin SP, Peakal DB. Pollutants and their fate in ecosystems. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis Ltd., 2012, pp. 386.
- Wang L, Scheffler BE, Willett KL. CYP1C1 messenger RNA expression is inducible by benzo[*a*]pyrene in *Fundulus heteroclitus* embryos and adults. *Toxicol Sci* 2006; 93: 331-340.
- Wassenberg DM, Di Giulio RT. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1658-1664.

- Wassenberg DM, Nerlinger AL, Battle LP, R.T. DG. Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon heterocycles, carbazole and dibenzothiophene, on *in vivo* and *in vitro* CYP1A activity and polycyclic aromatic hydrocarbon-derived embryonic deformities. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24: 2526-2532.
- Wedemeyer G. Uptake and distribution of Zn<sup>65</sup> in the coho salmon egg (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp Biochem Physiol* 1968; 26: 271-279.
- Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact* 1998; 110: 39-55.
- Weigt S, Hubler N, von Landenberg F, Braunbeck T, Broschard T. Teratogenic effects of metabolically activated trimethadione in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Lett* 2009; 189: S143.
- Weigt S, Huebler N, Braunbeck T, von Landenberg F, Broschard TH. Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Toxicology* 2010; 275: 36-49.
- Weigt S, Huebler N, Strecker R, Braunbeck T, Broschard TH. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 2011; 281: 25-36.
- Weigt S, Busquet F, von Landenberg F, Braunbeck T, Huebler N, Broschard T. Application of human and rat liver microsomes in teratogenicity testing using zebrafish *Danio rerio* embryos (mDarT). *Toxicol Lett* 2008; 180S: S96-S97.
- Wheelock CE, Eder KJ, Werner I, Huang H, Jones PD, Brammell BF, et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquat Toxicol* 2005; 74: 172-192.
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 347-570.
- Williams WM, Giddings JM, Purdy J, Solomon KR, Giesy JP. Exposures of aquatic organisms to the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos resulting from use in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 2014; 231: 77-117.
- Wogram J, Sturm A, Segner H, Liess M. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ Toxicol Chem* 2001; 20: 1528-1531.
- Wolińska L, Brzuzan P, Woźny M, Góra M, Łuczyński MK, Podlasz P, et al. Preliminary study on adverse effects of phenanthrene and its methyl and phenyl derivatives in larval zebrafish, *Danio rerio*. *Environ Biotechnol* 2011; 7, 1: 26-33.
- Wölz J, Brack W, Moehlenkamp C, Claus E, Braunbeck T, Hollert H. Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events. *Sci Total Environ* 2010a; 408: 3327-3333.
- Wölz J, Fleig M, Schulze T, Maletz S, Lübcke-von Varel U, Reifferscheid G, et al. Impact of contaminants bound to suspended particulate matter in the context of flood events. *J. Soils Sed.* 2010b; 10: 1174-1185.
- Yang F, Zhang Q, Guo H, Zhang S. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using *in vitro* fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 2003-2011.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol* 2009; 28: 245 - 253.
- Yen J, Donerly S, Levin ED, Linney EA. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. *Neurotox Teratol* 2011; 33: 735-741.

- Yu H, Ebert R-U, Kühne R, Schüürmann G. Prediction of the dissociation constant pKa of organic acids from local molecular parameters of their electronic ground state. *J Chem Inf Mod* 2011; 51: 2336-2344.
- Zhang X, Starner K, Spurlock F. Analysis of Chlorpyrifos Agricultural Use in Regions of Frequent Surface Water Detections in California, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 89: 978-984.

## ANHANG

## 5.1 Tabellarischer Überblick über die gesamten Testsubstanzen

Tab. 11: Testsubstanzen mit den verwendeten Stammlösungen und Konzentrationen.

Substanz	Versuchsreihe	Stammlösung [mg/L]	Konzentrationen [mg/L]
Methylquecksilberchlorid	Vortest 1 (statisch)	0,03	5, 10, 20, 40, 80
	Vortest 2 (statisch)	0,03	10, 25, 40, 55, 70, 85
	Vortest 3 (statisch)	0,03	10, 25, 40, 55, 70, 85
	Vortest 4	0,03	<b>10, 25, 40, 55, 70, 85</b>
	Vortest 5	0,03	<b>10, 20, 30, 40, 50, 60</b>
Methylquecksilberchlorid	V1	0,03	6,25, 12,5, 25, 50, 100
	V2	0,03	6,25, 12,5, 25, 50, 100
	V3	0,03	6,25, 12,5, 25, 50, 100
Chlorpyrifos	V1	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
	V2	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
	V3	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
	V1 (statisch)	600	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3
	V2 (statisch)	600	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3
	V3 (statisch)	600	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3
Chlorpyrifos + 10 µg/L b-NF	V1	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
	V2	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
	V3	600	<b>0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3</b>
Chinolin	Vortest 1	500	5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20
	Vortest 2	500	10, 12, 14, 16, 18, 20
	Vortest 3	500	15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60
	Vortest 4	500	5, 7,5, 10, 12,5, 15, 18,5, 20, 22,5
	Vortest 4 (statisch)	500	5, 7,5, 10, 12,5, 15, 18,5, 20, 22,5
	Vortest 5	500	6, 8, 10, 12, 14, 16, 20
	V1	500	5, 7,5, 10, 15, 20, 25
	V2	500	7,5, 10, 12,5, 15, 18,5, 20
	V3	500	7,5, 10, 12,5, 15, 18,5, 20, 25
	V4	500	<b>7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25</b>
	V5 (statisch)	500	7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25
	V6	500	<b>7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25</b>
	V7	500	<b>7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25</b>

Substanz	Versuchsreihe	Stammlösung [mg/L]	Konzentrationen [mg/L]
2,3-Benzofuran	Vortest 1	500	5,0, 7,5, 10, 12,5, 15, 20
	Vortest 2	500	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80
	Vortest 3	500	2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35
	Vortest 4 (statisch)	500	2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35
	V1	500	<b>8,5, 12, 19, 26, 33, 40</b>
	V2	500	<b>8,5, 12, 19, 26, 33, 40</b>
	V3	500	8,5, 19, 40, 80
	V4	500	<b>8,5, 12, 19, 26, 33, 40</b>
Bisphenol A	Vortest 2	500	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20
	Vortest 3	500	1, 2,8, 4,6, 6,4, 8,2, 10
	V1	500	<b>2, 4, 5, 6, 8, 10</b>
	V2	500	<b>2, 3, 4, 5, 6, 10</b>
Aroclor 1254 (Lot LB 68958)	V3	25000	0,4, 0,6, 0,8, 7, 13, 19, 25
	V5	25000	0,4, 0,6, 0,8, 7, 13, 19
Aroclor 1254 (Lot LB 89250V)	Vortest 1	25000	0,4, 0,8, 1,6, 3,125, 6,25, 12,5, 25
	V1	25000	3,125, 6,25, 12,5, 25, 50
	V2	25000	3,125, 6,25, 12,5, 25
	V3	25000	3,125, 6,25, 12,5, 25, 50
	V4	25000	3,125, 6,25, 12,5, 25, 50
Aroclor 1254 (Lot LB 83748V)	Vortest 1	25000	3,125, 6,25, 12,5, 25, 50
Aroclor 1254 (Lot LB 77779V)	V10	25000	<b>0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25</b>
	V11	25000	<b>0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25</b>
	V12	25000	<b>0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25</b>
Paraoxon	Vortest 1		2,5, 18,5, 34,5, 50,5, 66,5, 82,5, 100
	V2		<b>1, 2, 4, 8, 12, 16, 20</b>
	V3		<b>1, 2, 4, 8, 12, 16, 20</b>
<b>Sedimentextrakte</b>	<b>Versuchsreihe</b>	<b>g SEQ/ml</b>	<b>SEQ mg/ml</b>
Altrip	V1 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>
	V2 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>
	V3 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>
Ehrenbreitstein	V1 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>
	V2 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>

---

<b>Sedimentextrakte</b>	<b>Versuchsreihe</b>	<b>g SEQ/ml</b>	<b>SEQ mg/ml</b>
Ehrenbreitstein	V3 (statisch)	20	<b>0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20</b>
Vering Kanal	V1 (statisch)	20	<b>0,031, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5</b>
	V2 (statisch)	20	<b>0,031, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5</b>
	V3 (statisch)	20	<b>0,031, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5</b>

---

Markierung **fett**: verwendete Konzentrationen für die grafische Auswertung mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2009)