

Zusammenfassung der Dissertation

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung und Entwicklung von Methoden zur (Umwelt)Risikobewertung, die Erkenntnis in den Wirkungsmechanismus von Noxen geben und gleichzeitig nicht auf dem Einsatz von Tierversuchen basieren. Verschiedene Ebenen biologischer Organisation werden verwendet und beinhalten klassische Zellkultur bis hin zu Embryonalstadien eines Wirbeltiermodells. Der Fokus der Arbeit liegt auf der Anwendung des Zebrafischembryos (*Danio rerio*) in bekannten und in dieser Arbeit neu entwickelten, Mechanismus-basierten Toxizitätstests.

Die erste Studie beinhaltet die Identifikation von Schadstoffen in Sedimenten der Tiedeelbe und deren potentiellen Beitrag zum toxischen Potential nach Freisetzung durch intensive Baggerarbeiten. Effekt-dirigierte Analyse wurde verbunden mit chemischer Analyse der 16 USEPA - polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und zwei Zellkultur-basierten Versuchssystemen zur Identifikation und Berechnung von Dioxin-Äquivalenten (Bio-TEQs). In einer folgenden Massenbilanzierung konnten mit den Summenparametern der 16 PAKs zwischen 47 und 118% der biologischen Effekte erklärt werden. Die weitgehende Identifikation der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit wurde bisher selten berichtet. Die Kombination einer zellbasierten mechanistischen Bewertung von Umweltproben mit einem organismischen Ansatz wird im folgenden Kapitel präsentiert.

Genexpressionsuntersuchungen wurden an frühen Entwicklungsstadien des Zebrafischembryos angewendet, um mehr Information über den Effekt von komplexen Noxen-Gemischen zu erhalten. Veränderte Genexpression konnte teilweise mit dem Gefährdungspotential in Verbindung gebracht werden, das durch parallele zellbasierten Versuchen und chemische Analyse identifiziert worden war. Es blieb schwierig, zwischen spezifischer veränderter Genexpression und allgemeinen Detoxifikationsmechanismen zu unterscheiden. Als Konsequenz beschäftigte sich die folgende Untersuchung mit der Entschlüsselung der Antwort der Zebrafischembryotranskriptoms und der Identifikation eines gemeinsamen Genexpressionsprofils nach Exposition gegenüber Sedimentextrakte verschiedener Standorte. Die verschiedenen Proben ergaben spezifische Genexpressionsprofile. Aus diesen wurden 20 Markergene identifiziert, die verschiedene funktionale Genklassen widerspiegeln und als Marker in zukünftiger Routinetestung herangezogen werden können. Insgesamt ergab die Exposition der Zebrafischembryonen gegenüber verschiedenen Sedimentextrakten die veränderte Antwort von ähnlichen Stoffwechselwegen unabhängig von der genauen chemischen Zusammensetzung.

Um die aus einer komplexen Umweltprobe resultierenden komplexen Interaktionen zu reduzieren und dennoch den organismischen Ansatz beizubehalten, wurden für die Untersuchung im folgenden Kapitel nur eine Chemikalie und die kurze Exposition gegenüber einem frühen Entwicklungsstadium gewählt. Verschiedene Zeitfenster während der Blastula- und Gastrulaphase wurden gegenüber Bisphenol A (BPA) exponiert. Veränderte Phänotypen mit unterentwickelten, anterior gelegenen Strukturen wurden gegen Ende der Gastrulation beobachtet sowie ein ventralisierter Phänotyp bei 24 Stunden nach Befruchtung. Eine Reihe von Markergenen wurde aus der Genexpressionsanalyse gewonnen und mit quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion sowie in situ Hybridisierung ganzer Embryonen validiert. Schließlich konnte der wesentliche Stoffwechselweg der Interaktion mit BPA in einem sehr frühen Fenster der Entwicklung identifiziert werden. Ebenfalls konnte die phänotypische Rettung durch Ko-Exposition von BPA mit Retinsäurerezeptor- und Retinsäure-X-rezeptor-Agonisten erreicht werden.

Dennoch bleibt die Herausforderung einer Genexpressionsstudie nach Exposition gegenüber einer Noxe die Interpretation der Daten und die Etablierung einer kausalen Kette von veränderter Genexpression zu einem veränderten Phänotyp. Zusätzlich erfolgt die Interaktion der Chemikalie in frühen Lebensstadien in einer hoch dynamischen Umgebung und sollte in einem System abgebildet werden, das diese Dynamik widerspiegeln kann. Dafür wurde der Einfluss von BPA auf das komplexe Zellverhalten im entwickelnden Zebrafisch mit fluoreszent markierten Nuklei mit Hilfe von 3D-Zeitraffermikroskopie untersucht. Entwicklungsstadien von der Blastula bis zur frühen Organogenese wurden mit höchster räumlicher und zeitlicher Auflösung und unter physiologischen Bedingungen mit einem selbstgebauten Lichtscheibenmikroskop (LSM) aufgenommen. Der aktuelle Status als auch Ergebnisse der Datenverarbeitung und die Quantifizierung des Chemikalien-induzierten Effekts auf den Embryo werden dargestellt. Als ersten Schritt wurde, übereinstimmend mit vorigen Versuchen, die veränderte Epiboliebewegung der Exposition im Vergleich zu Kontrolle aufgezeigt.

Als Ergebnis der praktischen Arbeit mit dem selbstgebauten LSM wird im abschließenden Kapitel eine neue Anordnung des optischen Pfades für die LSM vorgeschlagen. Das neue Design würde die Einführung eines Probentischs und die Orientierung der Probe ohne Wachstumsbeschränkungen ermöglichen. Ebenfalls würde die parallele Aufnahme mehrere Objekte in einem Mikroskop als auch die Verbindung der LSM mit klassischen inversen Mikroskopen möglich werden.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse aller Mechanismus-basierten Studien die Anwendbarkeit der Zellkultur-basierten Versuche und vor allem den Einsatz des Zebrafischembryos für die *in vitro* Bewertung von Umweltproben und einzelnen Chemikalien. Des Weiteren wurde eine neue Methode zur Untersuchung der Interaktion einer Noxe mit dynamischen Prozessen während frühester Wirbeltierentwicklung vorgestellt und erste Ergebnisse präsentiert.