

## **Zusammenfassung der Disseration „Characterization of the development of cytochrome P450-dependent phase I biotransformation and bioactivation capacities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos“**

Der Fischembryo-Toxizitätstest (FET; OECD 236) gilt als vielversprechende Alternativ- bzw. Ersatzmethode zum akuten Fischtest (OECD 203), welcher im Rahmen der Risikobewertung von Chemikalien gesetzlich vorgeschrieben ist. Jedoch wurde Kritik an dem Einsatz des FETs als Alternativmethode zum akuten Fischtest geäußert. Diese Kritik wurde unter anderem darin begründet, dass Fischembryonen über keine oder eine nur äußerst eingeschränkte Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Fremdstoffen (Biotransformationskapazität) verfügen. Eine eingeschränkte oder gar fehlende Biotransformationskapazität könnte dazu führen, dass die Toxizität, von z.B. protoxischen Substanzen auf spätere Entwicklungsstadien von Fischen unterschätzt werden würde. Das Ziel der wissenschaftlichen Arbeit zur Erlangung der Promotion ist die funktionelle Charakterisierung der Entwicklung der funktionellen Biotransformationskapazität des Zebrabärblings im Verlauf der Embryonalentwicklung. Der Schwerpunkt der durchgeführten Experimente lag auf der funktionellen Charakterisierung, des für den Fremdstoffmetabolismus wichtigsten Enzymsystems, der Superfamilie der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP).

### **Teil 1: Entwicklung einer *in vivo* Methode zum Nachweis von CYP2-Aktivität im Zebrabärblingsembryo „der *in vivo* 7-Methoxykumarin-O-demethylierungs (MCOD) Assay“.**

Im Rahmen der Arbeit erfolgte die Entwicklung einer fluoreszenz-basierten Methode, welche in Kombination mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine *in vivo* Erfassung funktioneller säuger-homologer CYP2-Aktivität in embryonalen Stadien des Zebrabärblings ermöglicht.

### **Teil 2: Charakterisierung basaler räumlich-zeitlicher CYP2-Aktivitätsmuster**

Die in Teil 1 entwickelte Methode erlaubte erstmals mit hoher räumlich-zeitlicher Auflösung die Entwicklung von funktionellen CYP2-Aktivitätsmustern in Zebrabärblingsembryonen zu charakterisieren. Bereits 5 ½ Stunden nach der Befruchtung konnte mit Hilfe des *in vivo* MCOD-Assays CYP2 Aktivität in Zebrabärblingsembryonen detektiert werden. Die systematische Charakterisierung der entwicklungsabhängigen CYP2-Aktivitätsmuster offenbarte eine ausgeprägte räumlich-zeitliche sowie quantitative Dynamik und erlaubte Einblicke in endogene und exogene Funktionen der zugrundeliegenden CYP-Enzyme. Dieser Teil der Dissertation wurde in *Ecotoxicology and Environmental Safety* publiziert. 2020.

**Loerracher, A.,** Grethlein, M., Braunbeck, T., *In vivo* fluorescence-based characterization of cytochrome P450 activity during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020.

### **Teil 3: Erfassung konzentrationsabhängiger Modulierbarkeit der CYP2-Aktivität im Zebrabärblingsembryo durch prototypische CYP-Induktoren und Inhibitoren**

Zahlreiche Fremdstoffe (Xenobiotika) können die Expression und/oder Aktivität von fremdstoffmetabolisierenden CYP-Isoformen modulieren. Durch den Einsatz prototypischer CYP-Induktoren (z.B.  $\beta$ -Naphthoflapon, Rifampicin, Carbamazepin und Phenobarbital) und einem unspezifischen CYP-Inhibitor (Piperonylbutoxid) erfolgte die Charakterisierung der entwicklungsabhängigen Modulierbarkeit der CYP2-Aktivität in Zebrabärblingsembryonen. Die quantitative Auswertung der CYP-Aktivitäts-Modulation offenbarte eine ausgeprägte Altersabhängigkeit der Induktion, wobei die stärkste CYP2-Aktivitätssteigerung im frühen Entwicklungsstadium (36 hpf) und die schwächste in späten embryonalen Entwicklungsstadien des Zebrabärblings nachgewiesen wurde. Dieser Teil der Dissertation wurde in *Aquatic Toxicology* publiziert.

**Loerracher, A.**, Braunbeck T., Inducibility of cytochrome P450-mediated 7-methoxycoumarin-O-demethylase activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 2020.

### **Teil 4: Funktionelle Charakterisierung der embryonalen Bioaktivierungskapazität am Beispiel Chlorpyrifos**

Die funktionelle Charakterisierung der Bioaktivierungskapazität embryonaler Stadien des Zebrabärblings erfolgte indirekt über die Erfassung der neurotoxischen Wirkung (Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase) des bioaktivierungsbedürftigen Thiophosphorsäureesters Chlorpyrifos. Zur Eingrenzung der, für die Bioaktivierung verantwortlichen CYP-Isoformen wurden *in vivo* und *in vitro* Co-Inkubationsexperimente von Zebrabärblingsembryonen mit Chlorpyrifos und einem unspezifischen CYP-Inhibitor (Piperonylbutoxid) bzw. einem CYP3-spezifischen Inhibitor (Ketoconazol) durchgeführt. Die Hemmung des Enzym Acetylcholinesterase durch Chlorpyrifos und dessen bioaktivierten Metaboliten Chlorpyrifosoxon zeigte eine altersabhängige Variabilität mit einem Anstieg in der Hemmung mit voranschreitender Embryonalentwicklung. Einen indirekten Beweis für die bereits in Zebrabärblingsembryo stattfindende CYP-abhängige Bioaktivierung von Chlorpyrifos ergaben die durchgeführten Koinkubationsversuche mit dem CYP-Inhibitor Piperonylbutoxid und der daraus resultierende Reduktion des AChE-inhibitorischen Effekts von Chlorpyrifos. Durch den Einsatz der CYP3-Inhibitors Ketoconazol, konnte eine Beteiligung von CYP3-Aktivität an der Bioaktivierung von Chlorpyrifos in Zebrabärblingsembryo ausgeschlossen werden. Ein Manuskript wird derzeit finalisiert und in Kürze zur Veröffentlichung in einem peer-reviewed Journal eingereicht.

#### **Zusammenfassung:**

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der durchgeführten Experimente belegen, dass Zebrabärblingsembryonen bereits innerhalb der ersten Stunden nach der Befruchtung über eine funktionelle CYP-basierte Biotransformationskapazität verfügen. Darüber hinaus ergaben sich weitere Hinweise, dass Zebrabärblingsembryonen bereits ab 48 Stunden eine ausreichende Kompetenz zur Bioaktivierung von protoxischen Substanzen besitzen.

## **Erläuterung zur ökotoxikologische Relevanz der Disseration „Characterization of the development of cytochrome P450-dependent phase I biotransformation and bioactivation capacities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos“**

Der Fischembryo-Toxizitätstest (FET; OECD 236) gilt als vielversprechende Alternativ- bzw. Ersatzmethode zum akuten Fischttest (OECD 203), welcher im Rahmen der Risikobewertung von Chemikalien gesetzlich vorgeschrieben ist. Jedoch wird immer wieder Kritik an dem Einsatz des FETs als Alternativmethode zum akuten Fischttest geäußert. Diese wird unter anderem darin begründet, dass Fischembryonen über keine oder eine nur äußerst eingeschränkte Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Fremdstoffen (Biotransformationskapazität) verfügen. Im Falle einer fehlenden oder eingeschränkten Biotransformationskapazität embryonaler Fischstadien bestünden durch den Einsatz des FETs sowohl die Gefahr einer signifikanten Unterschätzung der Toxizität oder Teratogenität von Chemikalien, welche durch Stoffwechselprozesse bioaktiviert bzw. toxifiziert werden würden (proteratogene und protoxische Verbindungen), wie auch die Gefahr einer signifikanten Unterschätzung der Toxizität bzw. Teratogenität von Chemikalien, die durch Stoffwechselprozesse entgiftet werden würden. Das Ziel der eingereichten Abschlussarbeit war es die Entwicklung der Biotransformationskapazität des Zebraabärblings im Verlauf der Embryonalentwicklung zu charakterisieren. Der Schwerpunkt der durchgeführten Experimente lag auf der funktionellen Charakterisierung, des für den Fremdstoffmetabolismus wichtigsten Enzymsystems, der Superfamilie der Zytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP). Die durchgeführten Experimente umfassten unter anderem die Charakterisierung I) der akuten Toxizität von Fremdstoffen gegenüber embryonalen Stadien des Zebraabärblings (OECD 236), II) räumlich-zeitlicher CYP-Aktivitätsmuster im Verlauf der Embryonalentwicklung, III) der Beeinflussung der embryonalen CYP-Aktivität durch Modell-Chemikalien, IV) der entwicklungsabhängigen Kapazität zur Bioaktivierung protoxischer Verbindungen.

In der eingereichten Promotionsarbeit, dient als Nachweis für meine Befähigung zum wissenschaftlichen Arbeiten im Bereich der Ökotoxikologie. Sie deckt nicht nur Inhalte der folgenden von mir erfolgreich absolvierten Kurse ab

- Alternativmethode
- Aquatische Ökotoxikologie
- Molekulare Wirkmechanismen und Wirkungen auf die Zelle
- Toxikologie

sondern umfasste auch folgende wissenschaftliche Arbeitsweisen

- Statistische Auswertung wissenschaftlicher Daten
- Etablierung neuer Testprotokolle für die Anwendung beim Zebraabärbling
- Review wissenschaftlicher Daten

Die eingereichte Dissertation enthält Daten, die im Rahmen von zwei Bachelorarbeiten generiert wurden (Details siehe Dissertation). Beide Bachelorarbeiten wurden eigenständig von mir konzipiert und betreut. Die Ausführung aller weiteren Experimente, Analysen, sowie

Auswertung aller Daten, Einordnung in den Wissenschaftlichen Kontext, Interpretation und Diskussion erfolgte ausschließlich durch mich.