RiSKWa – Verbundprojekt NeuroBox Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf



Einleitung Verbund

Methodische Weiterentwicklung der dreistufigen In-vitro-Testbatterie zur Erfassung neurotoxischer Wirkungen und Koordination des Verbundes

Förderkennzeichen:	02WRS1419A-F
Projektlaufzeit:	01.03.2017 – 31.12.2020
Projektleiter:	Dr. Tamara Grummt, Jochen Kuckelkorn
Berichtzeitraum:	01.08.2017 – 31.12.2020

Aufgabenstellung

Das Verbundprojekt NeuroBox "Methodische Weiterentwicklung zur Erweiterung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf" hatte zum Ziel die Teststrategie zur Erfassung und Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen, die im Vorgängerprojekt "Tox-Box" entwickelt wurde, hinsichtlich des Endpunktes Neurotoxizität weiterzuentwickeln. Diese Strategie soll als Grundlage zur möglichen Minimierung von anthropogenen Spurenstoffen im Wasserkreislauf dienen. Dies erscheint angezeigt zu sein, da die Anzahl an neurodegenerativen Erkrankungen zunimmt, während die Entwicklung passender Therapiemöglichkeiten nicht Schritt halten kann und zudem die Testung auf neurotoxische Wirkungen nur auf wenige der bekannten Umweltchemikalien angewendet wurde. Die Begriffe Neurotoxizität und Neuroaktivität werden häufig synonym benutzt bzw. wird der Begriff der Neuroaktivität, der als eine akute funktionelle Störung definiert wird und somit im Gegensatz zur Entwicklungsneurotoxizität steht (Entwicklungsneurotoxizität: Effekte beruhen auf der Störung neurologischer Differenzierungen in Organismen), oft mit neurotoxischen Effekten gleichgestellt. In vivo Tests an Nagern stellen zurzeit immer noch die einzige regulatorisch anerkannte Möglichkeit zur Risikobewertung von Neurotoxizität in Europa dar. Behörden und Wasserversorger befinden sich dadurch in einer schwierigen Situation, da diese Tests langwierig, teuer und ethisch fragwürdig sind. Aufgrund der komplexen Wirkmechanismen der neurotoxischen Substanzen stellen die Versuche an lebenden Organismen zurzeit jedoch immer noch häufige Anwendung.

Der Einsatz von Alternativmethoden steht daher im Fokus des Projektes, damit zukünftig eine schnelle und sichere Bewertung von Einzelsubstanzen, aber auch von Mischwasserproben vorgenommen werden kann. Die Auswahl von 11 Kernsubstanzen. die viele dieser relevanten Wirkmechanismen abdecken, wurde im Verbundprojekt daher als Zielführend angesehen. Dies sind neben Acetylcholin-Inhibitoren (z. B. Organophosphate Carbamate) auch Nikotin-Rezeptoren und (Neonicotinoide), GABA-Rezeptoren (z. B. Polychlorcyclohexane und Fipronil), Natriumkanäle (z. B. Pyrethroide) und endokrine Disruptoren (z.B. Nonylphenole). Zudem stellt der integrative Ansatz von ökotoxikologischer Bewertung (Ressourcenschutz) und humantoxikologischer Bewertung (Gesundheitsschutz) im Zuge der europäischen Bestrebung nach harmonisierten Ansätzen eine wichtige Rolle um mögliche Kausalitäten Detektion eines Umweltschadstoffes zwischen der und einem neurotoxischen Effekt aufzuzeigen. Dieses breit gefächerte Expositionsszenario in Kombination mit der praxisbezogenen

2

Weiterentwicklung der Monitoringmöglichkeiten sowie der Einbeziehung und Fortentwicklung der (öko-)toxikologischen Endpunkte bietet die Grundlage zur ganzheitlichen Betrachtung des Wasserkreislaufs. Die Kausalität zwischen unterschiedlichen Wirkungsmechanismen auf den Menschen, ein Frühwarnsystem aus der Ökotoxikologie mit Bezug auf diese Wirkungen, der einhergehende Ressourcenschutz durch verbessertes Monitoring und die Identifizierung von "wirkenden" Umweltchemikalien sowie die Minimierung dieser (neuen) anthropogenen Schadstoffe stellen die Hauptaspekte des Projektes dar. Das geplante Verbundvorhaben als Anschlussprojekt der RiSKWa-Fördermaßnahme erfüllt mit dem Ziel der Bereitstellung eines umfassenden Methodeninstrumentariums zur Identifikation und Bewertung chemischer Stoffe im Wasser hinsichtlich ihres neurotoxischen Potenzials im Sinne des Vorsorgeprinzips zum Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt die förderpolitischen Ziele des BMBF.

Zur Erreichung der Ziele arbeiteten sechs Teilprojekte (TP) aus verschiedenen Fachrichtungen zusammen. Die Teilprojekte 1,3 und 4 nutzten zellbasierte Methoden zur Behandlung der humantoxikologischen Relevanz von neurotoxisch aktiven Substanzen. TP 1 fokussierte auf die Weiterentwicklung der bestehenden Testbatterie durch neue Zelllinien und Endpunkte. TP 3 analysierte bekannte humane Biomarker aus medizinischen Studien (-omics) für neurotoxische Effekte und ermittelte auf den Experimenten basierend neue Biomarker. TP 4 hatte mittels In-vitro-Charakterisierung zum Ziel, Marker für parallele neuroembryotoxische und endokrine Stoffwirkungen zu identifizieren, wodurch Erkenntnisse zu den zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen aufgedeckt werden können. Die Teilprojekte 2, 3 und 6 nutzten Fischmodelle für ökotoxikologische Fragestellungen. TP 2 entwickelte das bestehende Fischembryomodell bezüglich neuer organspezifischer Endpunkte und Fragen der Populationsrelevanz weiter. TP 3 setzte Zebrabärblinge bis zu einem Alter von fünf Tagen ein um ein Screeningverfahren basierend auf verschiedenen Verhaltensmustern zu etablieren. Weiterhin wurde im Mausmodell (olfaktorisches und visuelles System) an molekularen Wirkmechanismen und neuropathischen Veränderungen geforscht. Abschließend wurde die hormonstörende Wirkung einiger Stoffe am Zebrabärblingembryo untersucht (DNT). TP 6 betrachtete die möglichen Effekte von definierten Mischungen bekannter Einzelsubstanzen (Additive, oder unabhängige Wirkung) sowie von wässrigen Umweltproben mittels wirkungsbasierter Analytik (WBA) im Embryomodell. Zusätzlich sollte die Biotransformation neuroaktiver Substanzen betrachtet werden. Auch in TP 5 wurde die WBA eingesetzt mit dem Ziel die Erkennung von AChE-Inhibitoren durch HPTLC in Kombination mit zellbasierten Bioassays zu optimieren.

Insgesamt ist die Identifikation neurotoxischer Substanzen und deren Wirkungsmechanismen zum besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen neurologischen Krankheiten und Neurotoxizität essenziel, um bessere Testsysteme entwickeln zu können und eine sicherere Risikobewertung für Mensch und Ökosysteme zu erreichen.

Die Projektpartner und der Projektträger haben vereinbart, dass die jeweiligen Schlussberichte von den entsprechenden Teilprojekten erstellt und durch die Projektkoordination kumulativ an den Projektträger eingereicht werden. Die Projektkoordination verfasst das Berichtsblatt (deutsche und englische Version) für das gesamt Verbundprojekt

Die jeweiligen Erfolgskontrollberichte werden von den Verantwortlichen der Teilprojekte individuell an den Projektträger geschickt.

RiSKWa – Verbundprojekt NeuroBox Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf



Abschlussbericht Teilprojekt 1

Methodische Weiterentwicklung der dreistufigen In-vitro-Testbatterie zur Erfassung neurotoxischer Wirkungen und Koordination des Verbundes

Förderkennzeichen:	02WRS1419A
Projektlaufzeit:	01.03.2017 – 31.12.2020
Zuwendungsempfänger:	Umweltbundesamt, FG II 3.6 Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers, Heinrich-Heine-Str. 12, 08645 Bad Elster
Projektleiter:	Dr. Tamara Grummt, Jochen Kuckelkorn
Bearbeiter:	Jochen Kuckelkorn, Dr. Claudia Strobel
Berichtzeitraum:	01.08.2017 – 31.12.2020

Inhalt

1. Kurze Darstellung der ...

- 1.1 Aufgabenstellung
- 1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
- 1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens
- 1.4 Anknüpfung an den wissenschaftlichen und technischen Stand
- 1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

2. Eingehende Darstellung der Forschungsergebnisse

- 2.1 Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen
- 2.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
- 2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit
- 2.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans
- 2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte
- 2.6 Erfolgte Veröffentlichungen

3. Danksagung

1. Kurze Darstellung der ...

1.1 Aufgabenstellung

Das Verbundprojekt NeuroBox "Methodische Weiterentwicklung zur Erweiterung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf" hatte zum Ziel die Teststrategie zur Erfassung und Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen, die im Vorgängerprojekt "Tox-Box" entwickelt wurde, hinsichtlich des Endpunktes Neurotoxizität weiterzuentwickeln. Dies ist im Hinblick auf die Zunahme neurodegenerativer Erkrankungen und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung. Zudem wurde für den Bewertungsansatz die Betrachtung des gesamten Wasserkreislaufs. also ökotoxikologische und humantoxikologische Endpunkte, vorgenommen. Dies folgt prinzipiell der Idee des europäischen "One Health" Ansatzes, der gesundheitliche Beeinträchtigungen im versucht Kreislauf abzubilden. Die neurotoxischen aesamten Wirkmechanismen bilden ein komplexes Spektrum ab.

In Teilprojekt 1 sollte durch die Ableitung von gesundheitlichen Orientierungswerten (GOW) über eine mehrstufige Teststrategie eine Vorsorge-basierte Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen und die entsprechende Minimierung dieser Stoffe ermöglicht werden. Die beschriebene Aufgabenstellung entspricht den förderpolitischen Zielen des BMBF.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Als bundesweite Referenzstelle für die toxikologische Beurteilung trinkwasserrelevanter Stoffe weist das Umweltbundesamt (UBA) eine umfassende Fachkompetenz in der toxikologischen Untersuchung und biologischen Bewertung von trinkwasserassoziierten Stoffen auf. Das UBA (Fachgebiet II 3.6) zeichnet sich federführend verantwortlich für die Erstellung und Aktualisierung der bundesweit zentralen Liste der bewerteten Spurenstoffe nach dem GOW-Prinzip

(https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/trinkwasser/trinkwasser qualitaet/toxikologie-des-trinkwassers/gesundheitlicher-orientierungswertgow).

Im Forschungsverbund "Tox-Box" wurden In-vitro-Teststrategien zur Spurenstoffen Bewertung von anthropogenen bezüglich der bewertungsrelevanten Endpunkte (Gen- und Neurotoxizität, endokrine entwickelt. Das UBA besitzt langjährige experimentelle Wirkungen) Erfahrung bei der Entwicklung In-vitro-Testverfahren von und Β. Konzept Bewertungskonzepten (z. der gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW)). Auch die aktive Mitarbeit in verschiedenen wissenschaftlichen als auch regulativ ausgerichteten Fachgremien und Fachgesellschaften (z. B. WChG, SETAC, Sachverständigengremium "Endokrine Stoffe" des UBA, Sachverständigengremium "Ökotoxikologische Prüfmethoden" Sachverständigengremium des UBA. "Mikroverunreinigungen", DVGW, TWK, WHO) belegen die Kompetenz des Fachgebietes.

Das Fachgebiet II 3.6 setzt in den S1-Laboren zur Bewertung der Toxizität von Spurenstoffen humane Zelllinien aus verschiedenen Organen ein (u.a. HepG2, SH-SY5Y, Jurkat, U-937) und verzichtet somit auf den Einsatz von Versuchstieren.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Zielstellung in Teilprojekt 1 war die Untersuchung von Möglichkeiten einer Erweiterung und Optimierung der bestehenden zellbasierten Teststrategie zur Bewertung von neurotoxischen Effekten auf den Menschen. Anhand von sechs Arbeitspaketen (AP) wurden diese Ziele verfolgt und bearbeitet:

AP1 Validierung der dreistufigen Teststrategie aus dem Verbundprojekt Tox-Box

AP2 Kokultivierung verschiedener Zelltypen zur Stabilisierung der physiologischen Bedingungen zur verbesserten Simulation der in-vivo-Verhältnisse

AP3 Weiterentwicklung der dreistufigen Teststrategie durch Etablierung der Mikrogliazellen in der Zellkultur und in Testverfahren

AP4.1 Kultivierung und Differenzierung induzierter pluripotenter Stammzellen zur Erhöhung der Organspezifität der Testverfahren

AP4.2 Testung der differenzierten Stammzellen im Multi-Elektroden-Array und Erfassung der Wirkung neurotoxischer Spurenstoffe auf die Signalübertragung AP5 Untersuchungen an Modellen zur Simulation des Übertritts von Chemikalien über die Blut-Hirn-Schranke

AP6 Entwicklung einer Teststrategie für den Endpunkt Neurotoxizität durch Zusammenfassung aller Datensätze im Verbund

Ziel der zellbasierten Teststrategie ist die relativ schnelle und kostengünstige Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen, die lokal oder regional bei einem Wasserversorger detektiert werden und durch die bestehenden regulatorischen Bewertungsvorgaben (noch) nicht erfasst wurden. Aufgrund des alternativen in-vitro-Ansatzes ist dem Vorsorgegedanken hierbei Rechnung Es besondere zu tragen. wurden insgesamt zehn Kernsubstanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen mit der bestehenden und erweiterten Teststrategie untersucht. Dies waren Diazinon, Diazinon-oxon, Dichlorvos, Paraoxonmethyl, Aldicarb, Carbamazepin, Imidacloprid, Venlafaxinehydrochloride, tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCiPP), Nonylphenol.

1.4 Anknüpfung an den wissenschaftlichen und technischen Stand

Diverse Studien zeigten, dass anthropogene Stoffe, wie z. B. Pestizide, das Nervensystem nachhaltig schädigen humane und dadurch zu neurologischen Krankheiten, wie Parkinsonismus und Autismus, führen können. In diesem Zusammenhang nimmt die Anzahl der nicht nur altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen zu. Gleichzeitig wird davon ausgegangen, dass die Therapiemöglichkeiten stark eingeschränkt sind und die primäre Prävention somit den ersten Platz bei der Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen einnehmen muss. Primäre Prävention heißt, die Exposition gegenüber neurotoxischen Stoffen zu verhindern bzw. zu minimieren. Bisher wurden jedoch nur wenige Umweltchemikalien auf ihre neurotoxische Wirkung untersucht. Vier Hauptgruppen werden über die verschiedenen Zielstrukturen definiert, die von Insektiziden beeinflusst werden. Dies sind neben Acetylcholinesterasen (z. B. Organophosphate und Carbamate) auch Nikotin-Rezeptoren (Neonicotinoide), GABA-Rezeptoren (z. B. Polychlorcyclohexane und Fipronil) und Natriumkanäle (z. B. Pyrethroide). Neben diesen vier, insbesondere für Pestizide beschriebenen Wirkgruppen existieren 12 weitere Mechanismen über die Chemikalien bzw. Pharmaka wie Metoprolol oder Oxazepam in der Umwelt eine Störung des Nervensystems verursachen können.

Die zweite Teststufe, der in "Tox-Box" etablierten In-vitro-Teststrategie, in welcher zur Beurteilung möglicher neurotoxischer Wirkungen vergleichende Untersuchungen mit SH-SY5Y-Neuroblastomzellen und mit Hep G2-Leberkarzinomzellen zur Zellmorphologie und Nekrose sowie Apoptose und oxidativen Stress durchgeführt werden, wird durch das Blut-Hirn-Schrankenmodell zur Passage chemischer Substanzen optimiert, sodass eine sicherere Bewertung des neurotoxischen Potenzials möglich sein soll. Des Weiteren soll die dritte Teststufe, die bislang aus an primären humanen Astrozyten durchgeführten zytotoxischen und morphologischen Untersuchungen sowie aus Versuchen zur Neuritendifferenzierung und intrazellulären Signaltransduktion an Neuroblastomzellen bestand, durch die Verwendung von Mikrogliazellen und pluripotenten Stammzellen dahingehend verbessert, dass die Organspezifität des Testsystems erhöht wird und somit der In-vivo-Situation näher kommende Verhältnisse geschaffen werden. Durch die Ergebnissynthese der einzelnen Teilprojekte erfolgt die Optimierung der bisherigen Teststrategie, indem die neuen Erkenntnisse zu neurotoxischen/neuroentwicklungstoxischen Wirkmechanismen (auch hinsichtlich endokriner Beteiligung) in die Etablierung der Tests und ins GOW-Konzept einfließen.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zwischen dem Teilprojekt 1 des UBA wurden im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens NeuroBox ein wissenschaftlicher Austausch mit TP 4 der Hochschule Darmstadt (Zweitägiger Besuch von Prof. Pollet und Dr. Waldmann in Bad Elster) zur Vertiefung der zell-basierten Fragestellungen durchgeführt. Darüber hinaus wurden den WissenschaftlerInnen des TP 4 Zellen aus Bad Elster zur Verfügung gestellt.

Auf den jeweiligen gemeinsamen Projektbesprechungen wurden alle Teilprojekte über den Fortschritt der Arbeiten in TP 1 informiert, die Ergebnisse gemeinsam diskutiert und der Informationsaustausch sichergestellt.

2. Eingehende Darstellung der Forschungsergebnisse

2.1 Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen

Zielstellung in Teilprojekt 1 ("Methodische Weiterentwicklung der dreistufigen in-vitro-Testbatterie zur Erfassung neurotoxischer Wirkungen und Koordination des Verbundes") war die Untersuchung von Möglichkeiten einer Erweiterung und Optimierung der bestehenden zellbasierten Teststrategie zur Bewertung von neurotoxischen Effekten auf den Menschen. Anhand von sechs Arbeitspaketen (AP) wurden diese Ziele verfolgt und bearbeitet:

AP1 Validierung der dreistufigen Teststrategie aus dem Verbundprojekt Tox-Box

Im Berichtszeitraum wurde die Testung zur Validierung der dreistufigen Teststrategie auf Neurotoxizität mit den ausgewählten Testsubstanzen, aufgeführt in Tabelle 1, abgeschlossen. Der GABA-Rezeptor-Antagonist Diazepam wurde aus der Liste der Kernsubstanzen zurückgezogen, da ein Bestellvorgang nur auf Antrag über das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) möglich ist und bestimmte Lagerungsbedingungen für die Substanz vorgeschrieben sind, die im Projektverbund nicht durchgehend umgesetzt werden konnten.

Wirkweisengruppe (MoA)	Substanz
AchE-Inhibitoren (irreversibel)	Diazinon
	Diazinonoxon
	Dichlorvos
	Paraoxonmethyl
AchE-Inhibitoren (reversibel)	Aldicarb
GABA-Rezeptor-Antagonisten	Diazepam
Natriumkanalinhibitoren	Carbamazepin
nikotinische AchR- Inhibitoren	Imidacloprid

Tabelle 1: Darstellung der Kernsubstanzen und die jeweilige Wirkweise

SNRI	Venlafaxinehydrochloride
Endokrine Disruptoren	tris(1,3-dichloro-2- propyl)phosphate (TDCiPP)
Endokrine Disr. /Ostrogene	Nonylphenol

Zur Bewertung möglicher human-toxikologischer Effekte wurden die Stammlösungen der Kernsubstanzen, soweit dies möglich war, im Bereich der jeweiligen Wasserlöslichkeit und deutlich oberhalb, der in der Literatur recherchierten Umweltkonzentrationen in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Tabelle 2 gibt die Werte dazu wieder.

Tabelle 2: Darstellung der Stammlösungen in Relation zur jeweiligen Wasserlöslichkeit und Umweltkonzentration

Substanz	Stammlsg. [mM]	Stammlsg. [mg/ml]	Wasserlöslickeit [mg/ml]	Umweltkonz. [mg/l]
Diazinon- oxon	0,35	2,5	0,2451	n.d.
Carbamazepin	0,18	1,0	0,0177	0,0000107
TDCPP	0,09	1,0	0,0015	0,00025
Diazinon	0,33	2,5	0,039	0,0005
Nonylphenol	0,45	2,5	0,007	0,0657
Imidacloprid	0,31	2,0	0,61	0,036
Paraoxon- methyl	0,40	2,5	0,621	n.d.
Aldicarb	0,53	2,5	0,715	0,135
Dichlorvos	0,54	3,0	8	0,001

Venlafaxin-	1,27	10,0	572	0,000047
hydrochlorid				

Die Stammlösungen wurden in Bezug zu Trinkwasser (und auch zu Umweltkonzentrationen) in sehr hohen Konzentrationen angesetzt. Dies liegt im GOW-Konzept begründet. Das GOW-Konzept zielt auf eine semiquantitative Bewertung der Spurenstoffe ab. Entscheidend ist eine "ja/nein" Antwort auf die Frage, ob eine Substanz neurotoxische Effekte zeigt und nicht zwangsläufig eine analytisch-quantitative Bestimmung der Wirkung. Das GOW-Konzept weist für Substanzen, die neurotoxische Effekte aufweisen einen "pauschalen" regulatorischen Wert in Höhe von 0,3 µg/l aus, unterhalb dessen diese Art von Effekt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Entsprechend zeigen die folgende Tabelle 3 eine Übersicht der Ergebnisse aller durchgeführten Tests anhand von Lowest Observed Effect Concentrations (LOECs) und Tabelle 4 die Testmethoden mit den Bewertungskriterien und verwendeten Zelllinien in einer Übersicht dar. *Tabelle 3*: Übersicht der Ergebnisse der Biotestbatterie mit den Kernsubstanzen. Die Werte geben die jeweilige *Lowest-Observed-Effect-Concentration* (LOEC) in mg/ml an, außer bei ROS mit DHE in den Jurkat-Zellen. Hier handelt es sich um die *No-Observed-Effect-Concentration* (NOEC), da durch Effekte des Lösungsmittels DMSO auf die Jurkat-Zellen, die Substanzkonzentrationen nicht hoch genug konzentriert in das System gegeben werden konnten, um eine mögliche Effektkonzentration (LOEC) zu bestimmen.

	Casp (U937)	Casp (SH- SY5Y)	CDD+ (U937)	CDD+ (SHSY5Y)	Nekrose (Jurkat)	PI ROS DCF (HepG2)	ROS DCF (SHSY5Y)	ROS DHE (Jurkat)	RTCA (HepG2)	RTCA (SHSY5Y)	MMP (Jurkat)	Neuriten (SHSY5Y)
Diazinon-oxon	-	-	-	0,0125	-	-	-	-	0,025	-	-	-
Carbamazepin	-	-	-	0,004	-	-	-	0,025 (NOEC)	0,004	0,04	-	0,005
TDCCP	-	-	-	0,01	-	-	-	0,02 (NOEC)	0,0066	-	-	0,005
Diazinon	-	-	0,035	-	0,045	-	-	0,06 (NOEC)	0,04	0,05	0,025	0,01
Nonylphenol	-	-	0,0085	-	0,01	-	-	0,017 (NOEC)	0,01	0,015	0,0085	0,01
Imidacloprid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
Paraoxonmethyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
Aldicarb	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
Dichlorvos	0,04	-	-	-	-	-	-	-	0,0218	0,006	0,03	0,012
Venlafaxine	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	0,2	0,057	-	0,1

Testmethode	Kurzbeschreibung	Bewertungskriterium	Zelllinien
RTCA	Proliferations- und Zelltodnachweis durch	Index Berechnung : Anstieg der Impedanz	HepG2, SH SY5Y
	fortlaufende Registrierung der Impedanz von	bei Zellen unter Belastung durch den	
	Zellkulturen	Anstieg der Impedanz der	
		Negativkontrolle	
		positiv: Index <0,7	
		negativ: Index ≥0,7	
ROS – DCFH DA	ROS Nachweis durch Fluoreszenzmessung (DCF	RFU Quantifizierung in nM DCF mittels	HepG2, SH SY5Y
	Bildung) in RFU, mittels Fluorimeter,	einer DCF Eichkurve	
		positiv: >20 nM DCF*	
		negativ: ≤20 nM DCF*	
		*nach Abzug der Negativkontrolle	
ROS - DHE	ROS Nachweis durch die Erfassung	Bestimmung des prozentualen Anteils	Jurkat
	rotfluoreszierender Zellen, (Ethidium E ⁺	positiv: >10 % Rotfluoreszenz*	
	Bildung), mittels Flowzytometer	negativ: ≤10 Rotfluoreszenz*	
		*nach Abzug der Negativkontrolle	
Nekrose – Pl	Nachweis toter Zellen durch Rotfluoreszenz	Bestimmung des prozentualen Anteils	Jurkat
Propidiumiodid	(PI) Markierung des Zellkerns, mittels	positiv: >10 % Rotfluoreszenz*	
	Flowzytometer	negativ: ≤10 Rotfluoreszenz*	
		*nach Abzug der Negativkontrolle)	
Apoptose MMP (TMRE)	Nachweis einer MMP Zerstörung durch verringerte Fluoreszenz der Zellen, mittels Flowzytometer	Bestimmung des prozentualen Anteils positiv: >10 % Fluoreszenzverlust* negativ: ≤10 Rotfluoreszenz* *nach Abzug der Negativkontrolle	Jurkat

Tabelle 4: Übersicht der Testmethoden, Bewertungskriterien und eingesetzten Zelllinien

Apoptose (CDD ⁺ -ELISA)	Apoptosenachweis (Nukleosomen) mit einem peroxydasemarkierten Antikörper und folgender Peroxydasereaktion, photometrische Messung der Farbentwicklung (OD)	Index Berechnung: OD Werte bei Zellen unter Belastung durch die der Negativkontrolle positiv: Index >2,0	U 937
		negativ: Index ≤ 2,0	
Apoptose (Homogeneous Caspase Assay, DEVD- R110 als Substrat)	Apoptosenachweis (Caspasenaktivierung) durch Fluoreszenzmessung, (Rhodamin110 Freisetzung), Messung in RFU mittels Fluorimeter	RFU Quantifizierung in nM Rhodamin110 über R110 Eichkurve positiv: >50 nM R110 (nach Abzug der Negativkontrolle) negativ: ≤50 nM R110 (nach Abzug der Negativkontrolle)	U 937
Neuritendifferenzierung "Neurite Outgrowth Assay"	Neuriten- (Membran)markierung mit Fluoreszenzfarbstoff und Fluoreszenzmessung (RFU) mittels Fluorimeter	Index Berechnung: RFU-Werte bei Zellen unter Belastung durch die RFU- Werte der Negativkontrolle positiv: Index <0,7 negativ: Index ≥0,7	SH-SY5Y

Durch den Vergleich von Effektwerten von Nervenzellen und Zellen anderer Organtypen innerhalb dergleichen Testmethode können Hinweise auf neurotoxische Effekte gefunden werden, sofern die Nervenzellen sensitiver reagieren als die Vergleichszellen. Beim CDD⁺ ELISA wird der Endpunkt Apoptose (programmierter Zelltod) untersucht. Hierfür wurden Nervenzellen SH-SY5Y (humane, permanente Zelllinie aus Neuroblastom) und Blutzellen U-937 (humane, permanente Zelllinie aus Lymphozyten) eingesetzt.



Abbildung 1: Ergebnisse des CDD⁺ ELISA zu Venlafaxin mit U-937 (links) und SH-SY5Y (rechts) Zellen.

Ab einem Apoptoseindex von 2,0 liegt ein apoptotischer Effekt vor. Bei Venlafaxin (Abb. 1) kann ein LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) von 0,12 mg/ml für U-937 Zellen und ein LOEC von 0,20 mg/ml für SH-SY5Y Zellen berechnet werden. In diesem Fall liegt somit kein Hinweis auf einen neurotoxischen Effekt in Bezug auf den untersuchten Endpunkt vor, da die Blutzellen sensitiver reagieren als die Nervenzellen. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des CDD⁺ ELISA. Hinweise auf neurotoxische Effekte liegen hingegen für die Substanzen Diazinon-oxon, Carbamazepin und TDCCP vor.

Tabelle 5: Ergebnisse des CDD⁺ ELISA unter Angabe der jeweiligen LOECs [mg/ml]. Die Ergebnisse sind gerundet.

LOEC [mg/ml]	CDD+ (U937)	CDD+ (SHSY5Y)
Diazinon-oxon	-	0,0125
Carbamazepin	-	0,004
TDCCP	-	0,01
Diazinon	0,035	-
Nonylphenol	0,0085	-
Imidacloprid	-	-
Paraoxon-methyl	-	-
Aldicarb	0,04	-
Dichlorvos	-	-
Venlafaxin	0,1	0,2

Im Test auf Zellproliferation mithilfe des RTCA (Real-Time Cell Analyzer) wurden SH-SY5Y Zellen mit HepG2 Zellen (humane Leberzellen mit metabolischer Kompetenz) verglichen. Der Zellindex gibt den auf die Negativkontrolle normalisierten, prozentualen Wert der Zellproliferation an (Negativkontrolle = 1,0 (100 %)). Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Ergebnisse zur Exposition mit Dichlorvos über 24 Stunden und 48 Stunden. Der LOEC für SH-SY5Y Zellen wurde mit 0,006 mg/ml berechnet, während der LOEC für HepG2 Zellen bei 0,022 mg/ml ermittelt wurde. Somit kann dies als Hinweis auf einen neurotoxischen Effekt gedeutet werden.



Abbildung 2: Ergebnisse der Zellproliferation mittels RTCA nach Exposition mit Dichlorvos über jeweils 24 Stunden und 48 Stunden mit HepG2 (links) und SH-SY5Y (rechts) Zellen.

Tabelle 6 fasst die LOEC-Werte, die mittels RTCA zur Zellproliferation ermittelt wurden zusammen. Ab einem Zellindex < 0,7 (= 70 % der Negativkontrolle) wird ein Effekt auf die Zellproliferation gewertet. Neurotoxische Effekte können für Dichlorvos und Venlafaxin angenommen werden.

LOEC (24h) [mg/ml]	RTCA (HepG2)	RTCA (SHSY5Y)
Diazinon-oxon	0,025	-
Carbamazepin	0,004	0,04
TDCCP	0,0066	-
Diazinon	0,04	0,05
Nonylphenol	0,01	0,015
Imidacloprid	-	-
Paraoxon-methyl	-	-
Aldicarb	-	-
Dichlorvos	0,0218	0,006
Venlafaxine	0,2	0,057

Tabelle 6: Zusammenfassung der LOEC-Werte [mg/ml] für die Zellproliferation von HepG2 und SH-SY5Y Zellen nach 24 Stunden.

In der dritten Stufe der Biotestbatterie wird der Neuritenwachstumstest durchgeführt. Hierbei werden SH-SY5Y Zellen mit einer Testsubstanz exponiert und die Induzierung bzw. Inhibierung der Ausbildung von Neuriten mittels Fluoreszenz gemessen. Es wurde im Laufe des Projekts festgestellt, dass sich bei der Ausbildung von Neuriten gleichzeitig der Zellkörper verkleinert, so dass eine reine Messung der Fluoreszenz kein adäquates Mittel für die Feststellung von Neuritenwachstum darstellt (Abb. 3)



Abbildung 3: Mittelwerte von Fluoreszenzmessungen (6-fach Bestimmung) von SH-SY5Y Zellen mit und ohne Neuriten, sowie einer Hintergrundmessung.

Zudem wurde bei der Positivkontrolle Nocodazol ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen festgestellt, so dass die Expositionszeit reduziert oder eine andere Positivsubstanz gefunden werden musste. Staurosporin gewährleistet eine signifikante Neuriteninduzierung. In Abbildung 4 werden Messergebnisse zu der Modifikation des Neuritenwachstumstest dargestellt. Die Messung erfolgt nun im RTCA, wodurch nicht nur eine reine Fluoreszenzmessung, sondern ein direkter Bezug auf die Zellproliferation (Neuritenwachstum = Zellflächenvergrößerung) möglich ist. Der zytotoxische Einfluss der Positivkontrolle Nocodazol kann hierbei ebenfalls erfasst werden. Ab Expositionsbeginn mit Staurosporin wird auf die dann aktuelle Zellzahl normalisiert.



Abbildung 4: Zellindex von SH-SY5Y Zellen nach Exposition mit Staurosporin (Stauro) und verschiedenen Konzentrationen an Nocodazol (Noc) normalisiert auf Zeitpunkt der Zugabe von Staurosporin in der Zellkontrolle.

Neben den bereits vorgestellten Biotests wurden weiterhin vergleichende Versuche mit U-937 und SH-SY5Y Zellen auf Caspase-Aktivität, als Marker für Apoptose durchgeführt. Zusätzliche Zytotoxizitätstest sind der Mitochondrien-Membran-Potential (MMP) Test und der Test auf Nekrose mit dem Farbstoff PI, beide vorgenommen mit Jurkat-Zellen. Ergänzend wurden mit zwei verschiedenen Methoden Untersuchungen zu oxidativem Stress (Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies, ROS) mit HepG2, SH-SY5Y und Jurkat-Zellen vorgenommen.

Die Biotest-Batterie konnte mit den Kernsubstanzen weiter etabliert und bestätigt werden, da jede Substanz aufgrund der Summe der Tests als neuroaktiv/-toxisch erkannt wurde. Zudem lagen alle spezifischen Effekte über dem entsprechenden GOW-Wert von 0,3 μ g/l, so dass auch diese Einstufung bestätigt wurde.

Es fällt jedoch auf, dass Diazinon-oxon mit den Tests der 3. Teststufe (Neuriten-Wachstum und RTCA) nicht als neuroaktiv bewertet werden konnte. Weiterhin zeigten die Versuche zu oxidativem Stress mit dem Farbstoff DCF-HDA, sowohl mit der Zelllinie HepG2, als auch mit den SH-SY5Y Zellen bei keiner der Kernsubstanzen einen Effekt, so dass dieser Test in seiner jetzigen Form nicht relevant erscheint. Die Methode auf vergleichende Effekte zur Apoptose (Caspasen) zeigte nur bei Dichlorvos einen Effekt und hier auch nur in der Nicht-Nervenzelllinie, so dass auch hier der Verbleib in der Testbatterie hinterfragt werden muss.

AP2 Kokultivierung verschiedener Zelltypen zur Stabilisierung der physiologischen Bedingungen zur verbesserten Simulation der in-vivo-Verhältnisse

Immortalisierte, humane Endothelzellen (hCMEC/D3) und primäre, ausdifferenzierte humane Astrozyten (Primärzellen aus humanem Hirngewebe, NHA) konnten separat in der Zellkultur etabliert werden und zeigten über mehrere Wochen ein stabiles Wachstum.

Darauf aufbauend wurden Kultivierungsversuche mit *Hanging Inserts* durchgeführt. Die Endothelzellen, die die Barriere zwischen dem Blut und dem Gehirn darstellen, sowie die Astrozyten, die die "versorgenden" Strukturen der neuronalen Zellen übernehmen, konnten über mehrere Tage in den Mikrotiterplatten mit Einsätzen kultiviert werden (Abbildung 5).



Abbildung 5: Schema der Kokultur aus Endothelzellen und Astrozyten.

Die Grundlage für das Blut-Hirn-Schranken-Modell konnte durch die Etablierung der Kokultur in *Hanging Inserts* erfolgreich abgeschlossen werden.

Zu erwähnen ist hierbei jedoch auch der Umstand, dass beide Zelltypen eine sehr lange Lieferzeit hatten und somit eine lange Zeit für die Beschaffung im routinemäßigen Einsatz der Zellen eingeplant werden muss.

AP3 Weiterentwicklung der dreistufigen Teststrategie durch Etablierung der Mikrogliazellen in der Zellkultur und in Testverfahren

AP 3 konnte aufgrund verwaltungs-technischer Limitierungen nicht erfolgreich beendet werden. Primäre Mikrogliazellen sind nach den Aussagen der wenigen in Frage kommenden Lieferanten dauerhaft nicht lieferbar gewesen.

Als Alternative hätten immortalisierte Zelllinien dienen können. Diese werden z.B. in den USA zwar als S1-Organismen verkauft, in Deutschland aufgrund unterschiedlicher regulatorischer Vorgaben jedoch als S2 eingestuft. Das durchführende Labor des UBA (und die meisten Labore der Behörden und Wasserversorger) ist nur als S1-Labor zugelassen.

Dieser Umstand führte zu dem Schluss, dass die Voraussetzung einer standardmäßigen Anwendung zur risikobasierten Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen im "Laboralltag" in den Behörden und Wasserversorgern nicht gewährleistet werden kann. Die Mikrogliazellen haben sich in der Umsetzung als nicht tauglich herausgestellt.

AP4.1 Kultivierung und Differenzierung induzierter pluripotenter Stammzellen zur Erhöhung der Organspezifität der Testverfahren

Bei einem Kooperationstreffen zwischen der Hochschule Darmstadt (Frau Waldmann und Herr Pollet) und dem Umweltbundesamt am 09.04.2019 in Bad Elster wurde die Verwendung der "Induced human pluripotent stem cells" (ihPSC) für die Testbatterie anhand der Erfahrungen in Teilprojekt 4 diskutiert. Der hohe (zeitliche) Aufwand die Zellen zu kultivieren und zu differenzieren, sowie die relativ hohe Sensitivität der Zellen im Handling sprechen leider gegen einen Einsatz dieser Zellen in der routinemäßigen Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen bezüglich ihres neurotoxischen Potentials im Rahmen des GOW-Konzeptes.

AP4.2 Testung der differenzierten Stammzellen im Multi-Elektroden-Array und Erfassung der Wirkung neurotoxischer Spurenstoffe auf die Signalübertragung

Die hohen Anschaffungskosten eines Multielektrodenarrays (> 125.000 €) werden zudem als Problem für die Nutzung, gerade bei kleineren Wasserversorgern und Gesundheitsämtern gesehen. Sowohl das UBA, als auch die TU Darmstadt konnten im Projektverlauf bislang keine Anschaffung (UBA) bzw. Inbetriebnahme (TUD) eines MEA durchführen.

Neuere Entwicklungen von Herstellerseite haben jedoch in den letzten Monaten ein neues MEA-Gerät auf den Markt gebracht, dessen Preis niedriger ausfallen soll. Nähere Informationen lagen während der Erstellung des Schlussberichtes dem UBA noch nicht vor. Da es bislang jedoch nur wenige Anbieter dieser Geräte gibt, scheint ein besseres finanzielles Angebot auch in Zukunft aber eher unwahrscheinlich zu sein.

AP5 Untersuchungen an Modellen zur Simulation des Übertritts von Chemikalien über die Blut-Hirn-Schranke

Für die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (Transendothelial Electrical Resistance, TEER) wurde das neu angeschaffte EVOM2 eingesetzt. Die Messung stellte jedoch einige Schwierigkeiten dar bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. So ist derselbe Abstand zwischen Elektrode und Mikrotiterplatte bzw. Insert für eine reproduzierbare Datenaufnahme wichtig. Dies wird jedoch durch das Gerät nicht gewährleistet, da eine "Frei-Hand-Messung" vorgenommen wird. Selbst leichte Veränderungen der Position führen zu deutlich unterschiedlichen Messergebissen. Abbildung 6 zeigt Fotos der beiden Zelltypen in konfluenter Entwicklung auf der Mikrotiterplatte bzw. im Insert kurz vor Versuchsbeginn an Tag 0 und nach 24 Stunden.





Abbildung 6: Oben NHA und unten hCMEC/D3, jeweils links an Tag 0 und rechts nach 24 Stunden in der Negativkontrolle



Abbildung 7: Ergebnisse der TEER-Messung an Tag o (blau) und nach 24 Stunden (orange) in der Negativkontrolle (NK), Lösungsmittelkontrolle (A. bidest 1:10) sowie drei verschiedenen Konzentrationen von Sodiumxylenesulfonat.

Nach 24 Stunden traten größere Absenkungen des TEER sowohl in der Negativkontrolle, als auch in der Lösungsmittelkontrolle auf. Darauf basierend konnten die Ergebnisse der Testsubstanz (Sodiumxylenesulfonat) nicht valide ausgewertet werden. Zudem traten die bereits erwähnten Schwankungen zwischen den Messungen in allen Ansätzen auf.

Gegen Projektende (Oktober 2020) konnte das Nachfolgemodell EVOM3 erworben werden, dass eine Halterung zur Verbesserung dieser Problematik installiert hat. Aufgrund dieser späten Entwicklung konnten die Versuche jedoch nicht mehr in der Projektlaufzeit mit dem neuen Messgerät etabliert werden. Eine Fortführung der Arbeiten findet jedoch auch nach Projektende weiter statt, um die vielversprechenden Ansätze in die Praxis umsetzen zu können.

AP6 Entwicklung einer Teststrategie für den Endpunkt Neurotoxizität durch Zusammenfassung aller Datensätze im Verbund

Ziel der zellbasierten Teststrategie ist die relativ schnelle und kostengünstige Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen, die lokal oder regional bei einem Wasserversorger detektiert werden und durch die bestehenden regulatorischen Bewertungsvorgaben (noch) nicht erfasst werden. Aufgrund des alternativen in-vitro-Ansatzes ist dem Vorsorgegedanken hierbei besondere Rechnung Es wurden insgesamt zu tragen. zehn Wirkmechanismen Kernsubstanzen mit unterschiedlichen mit der bestehenden und erweiterten Teststrategie untersucht. Dies waren Diazinon, Diazinon-oxon, Dichlorvos, Paraoxonmethyl, Aldicarb, Carbamazepin, Imidacloprid, Venlafaxinehydrochloride, tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCiPP), Nonylphenol.

Basierend auf den Ergebnissen konnte die dreistufige Teststrategie angepasst und optimiert werden. Die vergleichenden Methoden zur Messung des oxidativen Stresses mit dem Farbstoff DCF-HDA und zur Messung der Apoptose (Bildung von Caspasen) mit den Zelllinien HepG2 (Leber) und SH-SY5Y (Neuronenvorläufer), die in Teststufe eins und zwei eigesetzt wurden, wurden aus der Testbatterie gestrichen. Es konnten damit keine Effekte der zehn ausgewählten, neurotoxisch-aktiven Kernsubstanzen festgestellt werden.

Die Methode auf vergleichende Effekte zur Apoptose (Caspasen) zeigte nur bei Dichlorvos einen Effekt und zudem nur in der Nicht-Nervenzelllinie, so dass auch hier eine Streichung aus der Testbatterie erfolgt. Weiterhin wurden drei Kernsubstanzen (Paraoxonmethyl, Aldicarb und Imidacloprid) in den ersten beiden Teststufen fälschlicherweise nicht als neurotoxisch eingestuft, während die 3. Teststufe diese Substanzen korrekterweise identifiziert hat. Eine Erweiterung der ersten beiden Teststufen bzw. eine Anpassung der hierarchischen Struktur der Testsysteme wurde dadurch nötig.

Eine wichtige Erkenntnis der Testungen ist die Bestätigung des Bewertungskonzeptes, das auf dem Konzept der Gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW) beruht, hinsichtlich der festgelegten Konzentrationsstufe in Höhe von 0,3 μ g/l für neurotoxische Effekte. Alle untersuchten Substanzen lagen bei den Effektkonzentrationen über diesem Schwellenwert, so dass weiterhin davon ausgegangen werden kann, dass bei Konzentrationen < 0,3 μ g/l keine gesundheitliche Beeinträchtigung durch neurotoxische Substanzen zu besorgen ist.



Abbildung 8: Teststrategie zur Bewertung neurotoxischer Substanzen im Trinkwasser gemäß GOW-Konzept mit Darstellung der entsprechenden Anpassungen. Durchgestrichener Text: Tests bzw. Zellen, die aus der Biotestbatterie herausgenommen bzw. nicht aufgenommen werden; rosafarben: Erweiterungen der bisherigen Testbatterie (GOW: gesundheitlicher Orientierungswert).

Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

In den aufeinander aufbauenden Arbeitspaketen 2 und 5 sollte zuerst die Kokultivierung verschiedener Zelltypen in AP 2 etabliert werden. Die gemeinsame Inkubation von immortalisierten Endothelzellen (hCMEC/D3) und primären Astrozyten (NHA) sollte als Ausgangsmodell für die stabile Simulation der Blut-Hirn-Schranke dienen. In AP 5 sollte im weiteren Verlauf der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) als Maß der Barrierefunktion der Endothelzellen unter Einfluss der verschiedenen Substanzen gemessen werden. Die Kokultivierung der beiden Zelltypen konnte erfolgreich etabliert werden, doch die testorientierte Umsetzung in AP 5 konnte nicht reproduzierbar und valide umgesetzt werden. Auch die zusätzliche Anschaffung eines Nachfolgemodells zur Messung des TEER $(EVOM2 \rightarrow EVOM3)$ konnte die Messunsicherheiten nicht beheben. Innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne wurden verschiedene Geräte zur Messung des TEER auf den Markt gebracht, was das große Entwicklungspotential dieses Testansatzes zeigt, leider aber auch die immer noch bestehenden Unwägbarkeiten. Die standardisierte Umsetzung im Rahmen der Teststrategie war unter diesen Umständen noch nicht möglich.

AP 3 konnte aufgrund verwaltungs-technischer Limitierungen nicht erfolgreich beendet werden. Primäre Mikrogliazellen sind nach den Aussagen der wenigen in Frage kommenden Lieferanten dauerhaft nicht lieferbar gewesen. Als Alternative hätten immortalisierte Zelllinien dienen können. Diese werden z.B. in den USA zwar als S1-Organismen verkauft, in Deutschland aufgrund unterschiedlicher regulatorischer Vorgaben jedoch als S2 eingestuft. Das durchführende Labor des UBA (und die meisten Labore der Behörden und Wasserversorger) ist nur als S1-Labor zugelassen.

Bezüglich des AP 4 stellte sich heraus, dass die Verwendung von ihPSC-Neuronen in der Testbatterie für Labore der Wasserversorger oder der Gesundheitsämter ungeeignet ist. Die Haltung sowie die Differenzierung der Zellen ist deutlich zu komplex, langwierig, teuer und störungsanfällig. Hierfür wird Fachpersonal benötigt, dass diese Zellen vorhalten kann. Die Erhöhung der Organspezifität, konnte somit nicht über die ihPSC erreicht werden.

2.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

2.2.1 Personal

Die entstandenen Ausgaben zum Projektende für die Beschäftigten (0812) belaufen sich auf 58.156,95 €. Finanziert wurden davon die Projektleitung

mit den jeweils in den Kostenkalkulationen 2018, 2019 und 2020 genannten Beschäftigungsdauern.

Weiterhin belaufen sich die entstandenen Ausgaben zum Projektende für die Beschäftigten (0817) auf 136.884,54 €. Finanziert wurden davon wissenschaftliche Mitarbeiter und Laborfachkräfte mit den jeweils in den Kostenkalkulationen 2018, 2019 und 2020 genannten Beschäftigungsdauern.

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Unter der Position 0843 für Verbrauchsmaterialien sind bis zum Projektende Ausgaben in Höhe von 39.466,67 € angefallen. Diese Mittel wurden benötigt für z.B. Bedarfe der Zellkultur (u.a. Medien, Pipetten, ZK-Platten), Referenzchemikalien, TEER-Messgerät sowie Lösungen und Chemikalien der Messgeräte.

2.2.3 Dienstreisen

Die entstandenen Ausgaben zum Projektende für Dienstreisen (0846) belaufen sich auf 2.823,96 €. Es sind für folgende Veranstaltungen Reisekosten entstanden: Projekttreffen des NeuroBox-Konsortiums.

2.2.4 Gegenstände und andere Investitionen

Unter der Position 0850 für Gegenstände und andere Investitionen sind bis zum Projektende Ausgaben in Höhe von 17.348 € angefallen. Diese Mittel wurden benötigt für den Ames-Manager.

Mit gesamten Ausgaben in Höhe von 254.680,12 € wurde der Gesamtfinanzierungplan in Höhe von 290.522,00 € (davon zugewiesen: 256.660,88 €) eingehalten.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die vorliegenden Ergebnisse und einhergehenden Herausforderungen zeigen, dass der Endpunkt der Neurotoxizität immer noch ein großes Entwicklungspotential besitzt. In Bezug auf mögliche Bewertungsstrategien auf nationaler und internationaler regulatorischer Ebene stellt der Ansatz der dreistufigen Teststrategie im Rahmen des GOW-Konzeptes eine schnelle, kostengünstige aber auch Vorsorge-basierte und gesundheitlichausgerichtete Möglichkeit dar die komplexen Wirkmechanismen abzubilden. Es zeigten sich dabei auch die Herausforderungen die bestehende Strategie unter der Maßgabe des Einsatzes von einfachen, schnellen und kostengünstigen Testmethoden weiterzuentwickeln, die dennoch eine hohe Sicherheit in Bezug auf Sensitivität und Spezifität darstellen.

Die Bearbeitung des Forschungsvorhabens erfolgte unter Einhaltung des Finanzierungsplanes (Personalmittel, Sachmittel, Investitionen). Die über das Projekt angestellten WissenschaftlerInnen und Laborfachkräfte bearbeiteten die sechs Arbeitspakete des Teilprojektes gemeinsam. Innerhalb des Teilprojektes 1 mussten jedoch, bedingt durch zwei Elternzeiten, mittel- und langfristige Personalengpässe auf wissenschaftlicher Ebene kompensiert werden. Eine kostenneutrale Verlängerung wurde aufgrund dieser Umstände für das TP 1 im Rahmen des Verbundprojektes beantragt und genehmigt.

Während der Laufzeitverlängerung kam es zu einer mehrmonatigen, vollständigen Schließung der Labore im Frühjahr 2020, sowie im Anschluss daran an eine mehrwöchige Phase im reduzierten Schichtbetrieb. Dies führte zu weiteren Verzögerungen und erschwerten Bearbeitung der Projektaufgaben, die zum Teil in der unvollständigen Bearbeitung der Arbeitspakete mündete.

Das Projekt und die assoziierten Themenfelder anthropogene Spurenstoffe und Neurotoxizität wurden in den aufgeführten Publikationen einem Fachpublikum vorgestellt (siehe 2.6).

2.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Ableitung von wissenschaftlich belastbaren und verlässlichen GOW der vorsorgebasierten und nachhaltigen Sicherung der dient Trinkwasserversorgung. Hinzu kommen die resultierende Reduzierung von Tierversuchen und die schnellere und sichere Routineanwendung in den Laboren der Wasserversorger und Behörden. Die Implementierung des risikobasierten Ansatzes in der neuen europäischen Trinkwasserrichtlinie zum Schutz der Trinkwasserressourcen, der ebenso in nationales Recht (Trinkwasserverordnung) umgesetzt werden muss, bietet einen sehr guten Anknüpfungspunkt für die Forschungsergebnisse dieses Projektes. Die Kombination aus ökotoxikologischer und humantoxikologischer Bewertung (Ressourcen-/Gesundheitsschutz), sowie die Stärkung von alternativen Testmethoden (in vitro, Fischembryomodell, etc.), die durch die Ankündigung der US-EPA ab 2035 auf in-vivo-Versuche mit Säugetieren zu verzichten und hierfür auf in-vitro-Testverfahren umzusteigen betont wird, hebt die Relevanz und die Anwendungsmöglichkeiten der Projekterkenntnisse noch einmal besonders hervor.

Die aktualisierte Testbatterie zur Erkennung und Bewertung von neurotoxischen Effekten anthropogener Spurenstoffe im Trinkwasser wird im Umweltbundesamt routinemäßig im Rahmen der Anwendung des GOW-Konzeptes eingesetzt. Eine stete Weiterentwicklung der Teststrategie wird auch nach Beendigung des Forschungsprojektes fortgeschrieben und offene Punkte, wie z.B. der Einsatz des Blut-Hirn-Schranken Modells mittels TEER-Messung, weiterbearbeitet.

Die Erfahrungen und Ergebnisse des (Teil-)Projektes werden auch in Hinsicht auf die Weiterentwicklung der Risikobewertung von komplexen Gemischen berücksichtigt werden. Zurzeit findet die Bewertung auf Basis von Einzelsubstanzen statt, zukünftig wird auch ein regulatorischer Ansatz für Mischtoxizität entwickelt werden (müssen).

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte

Während der Projektlaufzeit sind dem Zuwendungsempfänger keine Arbeiten über Fortschritte in der Anwendung einer mehrstufigen, zellbasierten Teststrategie zur Bewertung von neurotoxischen Spurenstoffen im Trinkwasser bekannt geworden.

2.6 Erfolgte Veröffentlichungen

Legradi, J. B., et al. "An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment." Environmental Sciences Europe 30.1 (2018): 1-34.

Ahting, M., et al. Recommendations for reducing micropollutants in waters. German Environment Agency, 2018.

Jochen Kuckelkorn, Lukas Frese, Carola Schuller, Michael Gundlach, Ann-Cathrin Haigis, Petra Waldmann, Stefan Weiß (2020): Projekt NeuroBox – Wie beeinflusst Wasser unser Nervensystem?; Vom Wasser 118 (2020) 1, 1–32

3 Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Förderung des Teilprojekts des

Umweltbundesamtes im Rahmen des Verbundvorhabens "Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf (NeuroBox)".

Wir bedanken uns insbesondere für die freundliche und hilfreiche Unterstützung während des Forschungsvorhabens bei Dr. Daniel Jost und Ellen Ernst vom Projektträger Karlsruhe Wassertechnologie.

Für die kollegiale und konstruktive Zusammenarbeit danken wir allen Projektpartnern des NeuroBox-Konsortiums.

RiSKWa – Verbundprojekt NeuroBox Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf



Abschlussbericht Teilprojekt 2

Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für Mensch und Umwelt

Förderkennzeichen:	02WRS1419B
Projektlaufzeit:	01.03.2017 – 31.12.2020
Zuwendungsempfänger:	Aquatische Ökologie und Toxikologie, COS – Centre for Or- ganismal Studies, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, D-69120 Heidelberg
Projektleiter:	Prof. Dr. Thomas Braunbeck
Bearbeiter:	Lukas Frese, Carola Leitner Prof. Dr. Thomas Braunbeck

Berichtzeitraum: 01.08.2017 – 31.12.2020

Inhalt

	Inhalt	2
	Zusammenfassung	4
	Summary	5
1.	Aufgabenstellung	6
2.	Ansatz des hier beschriebenen Teilprojekts	7
3.	Stand der Wissenschaft und eigene Vorarbeiten vor Beginn des Projekts	8
4.	Grundsätzliche Überlegungen zu den Methoden	11
5.	Ergebnisse in NeuroBox-Teilprojekt 2: "Neurotoxizität bei Fi- schen: Bedeutung für den Menschen"	12
5.1	AP 1.1: Ermittlung der akut toxischen Wirkung von Substanzen mit Hilfe des Fischembryotests (OECD TG 236)	12
5.2	AP 1.2: Untersuchung typischer neurotoxikologischer Endpunkte	13
5.2.1	Hemmung der Acetylcholinesterase	13
5.2.2	Neuromasten-Assay	15
5.2.3	Schädigungen in der Retina	17
5.2.4	Schädigungen im olfaktorischen Epithel	28
5.3	AP 3: Langzeitbelastung von Zebrabärblingen mit neurotoxischen Substanzen	34
5.3.1	Fluoxetin	34
5.3.2	Paraoxon-methyl	38
5.3.3	TDCPP (Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphat)	40
5.2.4	Carbamazepin	41
5.4	AP 4: Veränderungen im Schwimmverhalten früher Entwicklungs- stadien	42

6.	Arbeiten, die ausstehen bzw. zu keiner Lösung geführt haben	44
7.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	47
8.	Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	
9.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	49
10.	Bezug zu förderpolitischen Zielen des BMBF	50
11.	Zitierte Literatur	50
12.	Bisherige eigene Publikationen im Berichtszeitraum, die auf RiSKWa-Projekte zurückgehen, sowie geplante Publikatio- nen	54
13,	Anhang	55
13.1	Anhang 1: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (<i>Danio rerio</i>) nach Belastung mit ausgesuchten potentiell neurotoxischen Sub- stanzen	55
13.2	Anhang 2: Protokoll zur Durchführung der Verhaltensexperimente nach Langzeitbelastung (AP 3)	68

Zusammenfassung

Im Verbundprojekt NeuroBox ("Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf") sollten im Anschluss an das BMBF-Projekt ToxBox die Teststrategie zur Erfassung und Bewertung anthropogener Spurenstoffe im Wasserkreislauf vor allem im Hinblick auf Neurotoxizität weiterentwickelt werden. Ziel war es, (1) Grundlagen zur Beurteilung der toxikologischen und ökotoxikologischen Relevanz neurotoxischer Effekte zu schaffern, (2) nach Möglichkeit die Kausalität zwischen Umweltschadstoff und neurotoxischem Effekt aufzuzeigen, (3) Methoden zum praxisbezogenen Monitoring zu entwickeln und dabei (4) Alternativmethoden zur Ermittlung neurotoxischer Effekte bei Mensch und (Säuge-)Tieren voranzubringen.

Das in der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie am Center for Organismal Studies der Universität Heidelberg bearbeitete Projekt "Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für Mensch und Umwelt" widmete sich vor allem der Entwicklung von Alternativmethoden, indem Fische – speziell Fischembryonen – im Hinblick auf ihre Eignung zum Nachweis für neurotoxische Effekte und als Ersatz für Experimente mit Säugetieren geprüft wurden. Der Schwerpunkt lag dabei zum einen auf der Entwicklung einfacher, schneller und kostengünstiger Tests, die sich auch für ein Screening eignen. Es konnte gezeigt werden, dass neben dem klassischen Marker Acetylcholinesterase (± selektiv für Phosphorsäureester und Carbamate) vor allem fluoreszenzbasierte Methoden zum mikroskopischen Nachweis von Schädigungen großer Sinnesorgane (Seitenliniensystem, Auge, Nase) bei tierschutzrechtlich nicht geschützten Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) für eine sensitive Erfassung neurotoxischer Effekte sehr gut geeignet sind. Da diese fluoreszenzbasierte Methoden nicht spezifisch auf bestimmte Schadstoffklassen reagieren, bietet sich eine Kombination verschiedener Methoden an.

Die Modellneurotoxine Aldicarb, Carbamazepin, Diazinon, Diazinon-Oxon, Dichlorvos, Nonylphenol, Paraoxon-Methyl, TDCiPP (Tris(1,3-dichlor-2-propyl)phosphat) und Venlafaxinhydrochlorid wurden mit Hilfe einer Testbatterie aus zwei neu entwickelten Assays (Retina-Assay und Olfaktorisches Epithel-Assay) und zwei bereits in ToxBox etablierten Assays (Neuromasten- und Acetylcholinesterase-Assay) untersucht. Von den 9 getesteten Substanzen sprach bei 7 mindestens ein Endpunkt an. Berücksichtig man, dass bei 20 % der Embryonen nach Belastung mit TDCiPP nur 1 Auge entwickelt war, wurden mit der ausgewählten Testbatterie 8 von 9 Modellneurotoxine erkannt (Trefferquote: 89 %).

Im zweiten Projektteil widmete sich das Projekt an der Universität Heidelberg der Frage, wie relevant neurotoxische Effekte in Fischembryonen sind. Hierzu wurden Zebrabärblinge in Langzeitexperimenten über längere Zeiträume typisch neurotoxischen Substanzen exponiert und auf klassische populationsrelevante Endpunkte (Überlebensrate, Wachstum, Reproduktion) sowie Verhaltensänderungen (für die populationsrelevante Konsequenzen wahrscheinlich sind) untersucht. Tatsächlich konnten für einige neurotoxische Substanzen solche klassischen populationsrelevante Effekte nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass diese nicht in allen Experimenten gefunden wurden, deutet auf wenigstens eine gewisse Spezifizität der Veränderungen hin.

Trotz erheblicher technischer Herausforderungen bei der videotechnischen Nachverfolgung juveniler (kleiner) Fische konnte zunächst gezeigt werden, dass bei adulten Fischen etablierte Verhaltenstests auf Gruppen juveniler Tiere übertragbar sind, wobei insbesondere das Verhalten der Fische nach Umsetzen in ein neues Aquarium ("*Novel tank*-Test") äußerst empfindlich auf neurotoxische Substanzen anspricht und daher für Screeningzwecke empfohlen werden kann..

Das Teilprojekt "Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für Mensch und Umwelt" konnte damit nachweisen, dass Neurotoxizität auch in embryonalen und juvenilen Stadien von Fischen reproduzierbar nachgewiesen werden und durchaus populationsrelevante Effekte nach sich ziehen kann. Die Frage nach der Übertragbarkeit der Befunde zur Neurotoxizität bei Fischen auf Säugetiere ist noch in Bearbeitung.
Summary

Following the BMBF project ToxBox, the purpose of the joint project NeuroBox ("Further development of methodologies for the assessment of neurotoxic effects in the water cycle"), was to develop further the testing strategy for the detection and assessment of anthropogenic trace substances in the water cycle, especially with regard to neurotoxicity. The aim was (1) to establish a basis for assessing the toxicological and ecotoxicological relevance of neurotoxic effects, (2) to demonstrate, if possible, the causality between environmental pollutant and neurotoxic effect, (3) to develop methods for practice-related monitoring and, in the process, (4) to advance alternative methods for determining neurotoxic effects in humans and higher vertebrates (mammals).

The project "Neurotoxicity in Fishes: Significance for Humans and the Environment" was primarily dedicated to the development of alternative methods by testing fish – especially fish embryos – with regard to their suitability for the detection of neurotoxic effects and as a substitute for experiments with mammals. The focus was on the one hand on the development of simple, rapid and inexpensive tests that are also suitable for screening. It could be demonstrated that, besides the classical marker acetylcholinesterase (± selective for phosphoric acid esters and carbamates), fluorescence-based methods for the microscopic detection of damage to large sensory organs (lateral line system, eye, nose) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos that are not protected under current animal welfare legislation are particularly well suited for the sensitive detection of neurotoxic effects. Since these fluorescence-based methods seems appropriate.

The model neurotoxins aldicarb, carbamazepine, diazinon, diazinon-oxon, dichlorvos, nonylphenol, paraoxon-methyl, TDCiPP (tris(1, 3-dichloro-2-propyl)phosphate), and venlafaxine hydrochloride were tested using a battery of assays consisting of two newly developed assays (retinal assay and olfactory epithelial assay) and two assays already established in ToxBox (neuromast and acetyl-cholinesterase assays). Of the 9 substances tested, at least one endpoint responded in 7. Considering that in 20% of the embryos only 1 eye was developed after exposure to TDCiPP, 8 of 9 model neurotoxins (89 %) were detected with the selected assay battery.

The second part of the project at the University of Heidelberg was devoted to the question of how relevant neurotoxic effects are in fish embryos. For this purpose, zebrafish were exposed to typical neurotoxic substances in long-term experiments and examined for classical population-relevant endpoints (survival rate, growth, reproduction) as well as behavioral changes (for which population-relevant consequences are likely). Indeed, for some neurotoxic substances such classical population-relevant effects could be demonstrated. The fact that these were not found in all experiments suggests at least some specificity of the changes.

Despite considerable technical challenges in the video tracking of juvenile (small) fish, it could be shown that behavioral tests originally established in adult fish can be transferred and adapted to groups of juvenile fish. In particular, the behavior of fish after transfer to a new aquarium ("novel tank test") seems to be extremely sensitive to neurotoxic substances and can thus be recommended for monitoring purposes.

The subproject "Neurotoxicity in fish: Significance for humans and the environment" was thus able to document that neurotoxicity can also be demonstrated reproducibly in embryonic and juvenile stages of fish and that neurotoxic effects may have population-relevant consequences.

The question as to the transferability of the findings on neurotoxicity in fish to mammals is still under investigation.

1. Aufgabenstellung

Im Verbundprojekt NeuroBox ("Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf") wurden mittels einer Weiterentwicklung der im "ToxBox"-Verbund entwickelten Teststrategie anthropogene Spurenstoffe im Wasserkreislauf erfasst und hinsichtlich ihrer Neurotoxizität bewertet. Im Einzelnen bestanden die Ziele des Gesamtprojekts in folgenden Punkten:

- (1) Schaffung von Grundlagen zur Beurteilung der toxikologischen und ökotoxikologischen Relevanz neurotoxischer Effekte;
- (2) Aufzeigen der Kausalität zwischen Umweltschadstoff und neurotoxischem Effekt;
- (3) Weiterentwicklung von Methoden zum praxisbezogenen Monitoring (enger Anschluss an Vorgängerprojekt ToxBox);
- (4) Entwicklung von Alternativmethoden zur Ermittlung neurotoxischer Effekte bei Mensch und (Säuge-)Tieren.

Dieser Bericht fasst die Ergebnisse des zweiten Teilprojektes, "Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für Mensch und Umwelt", zusammen, das in der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie & Toxikologie am Center for Organismal Studies an der Universität Heidelberg bearbeitet wurde. Im Rahmen dieses Teilprojektes wurden in vier Arbeitspaketen (APs) folgende Fragen untersucht:

Teil A – Toxikologie: Inwieweit sind neurotoxische Effekte im Embryo des Zebrabärblings prädikativ für neurotoxische Effekte in Säugetieren incl. dem Menschen?

- (1) AP 1: Wie spezifisch sind neurotoxische Effekte bei Wirbeltieren?
 - AP 1.1: Ermittlung der akut toxischen Wirkung von Substanzen, die aus Experimenten mit Säugern als klassische Neurotoxine gelten, im Fischembryotest (OECD TG 236)
 - **AP 1.2:** Entwicklung einer Testbatterie durch Untersuchungen typischer neurotoxikologischer Endpunkte (Konzentrationen unterhalb des EC₁₀).
 - Acetylcholinesterase
 - Neuromasten-Assay (Stengel et al. 2016)
 - Störungen im olfaktorischen Epithel
 - Schäden in der Retina
 - **AP 1.3:** Vergleich der Beobachtungen mit Befunden zu Säugetieren und Mensch aus der Literatur
- (2) **AP 2:** Entwicklung eines Prädikationsmodells Fischembryo → Säugetier für die Reaktion auf neurotoxische Substanzen

Teil B – Ökotoxikologie: Welche Bedeutung haben neurotoxische Effekte in der Ökotoxikologie? Sind neurotoxische Effekte in Fischembryonen populationsrelevant?

- (3) AP 3: (Langzeit)Exposition von Zebrabärblingen gegenüber Substanzen, die sich in AP 1 als typische Neurotoxine erwiesen haben, mit dem Ziel, neurotoxische Effekte mit populationsrelevanten Endpunkten (Überlebensrate, Wachstum, Reproduktion) zu korrelieren
 - Early Life-Stage-Tests (OECD TG 210)
 - o Reproduktionstests
- (4) **AP 4**: Veränderungen im Schwimmverhalten von embryonalen und larvalen Entwicklungsstadien des Zebrabärblings
 - Photomotor response in frühen Embryonalstadien des Zebrabärblings
 - o Schwimmfähigkeitstests

Als erstes wurde das Hauptaugenmerk auf die Etablierung der zu verwendenden Testsysteme, die Suche nach geeigneten "Modellneurotoxinen", die als Positivkontrolle dienen sollen, und die Prüfung erster Substanzen, die im Verbund festgelegt wurden, gelegt. Anschließend wurden mit den so entwickelten Testsystemen weitere Substanzen geprüft und andere Testsysteme weiterentwickelt.

2. Ansatz des hier beschriebenen Teilprojekts

Neben Wirbellosen gilt das Augenmerk ökotoxikologischer Untersuchungen vor allem Fischen als den etablierten Vertretern aus der Klasse der Wirbeltiere, zumal sich Befunde an Fischen leichter auf den Menschen übertragen lassen sollten als Befunde an Wirbellosen. In ökotoxikologischen Untersuchungen verschiedenster Art konnte in den letzten Jahren vor allem der Zebrabärbling (*Danio rerio*) für eine Vielzahl von Endpunkten etabliert werden, so dass dieses Tiermodell immer mehr zum "Mausäquivalent" der aquatischen Ökotoxikologie wurde.

Aus der Sicht des Tierschutzes wird der routinemäßige Einsatz von Fischen in ökotoxikologischen Untersuchungsprogrammen in den letzten Jahren jedoch zunehmend kritisch gesehen, so dass intensiv an der Entwicklung von Alternativ- und Kompromisslösungen gearbeitet wird. Ein solcher Kompromiss stellen Experimente mit diversen frühen Entwicklungsstadien des Zebrabärblings dar, wobei Entwicklungsstadien bis zum Alter von 120 Stunden nach dem Wortlaut der neuen EU-Tierschutzrichtlinie (EU 2010) als nicht im Sinne der Richtlinie geschützte Stadien betrachtet werden (so dass z.B. kein Tierversuchsantrag gestellt werden muss (Strähle et al. 2012).

Adverse neurotoxische Effekte dürften sich bei Fischen vor allem auf Bewegung und Verhalten auswirken, so dass Untersuchungen zu Veränderungen von Bewegung und Verhalten selbst in sehr frühen Embryonalphasen geeignet erscheinen, die biologischen Konsequenzen derartiger Effekte nachzuweisen (*Photomotor response assay* nach Kokel & Petersen 2011). Andererseits bieten spätestens etwas weiter entwickelte

Larvalstadien des Zebrabärblings (ca. 10 Tage) die Möglichkeit, die Effekte neurotoxischer Stoffe auf das Schwimmverhalten als einen zentralen populationsrelevanten Parameter zu überprüfen. Selbstverständlich handelt es sich bei diesen Experimenten um genehmigungspflichtige Tierversuche (Alter > 120 h; Strähle et al. 2012).

3. Stand der Wissenschaft und eigene Vorarbeiten vor Beginn des Projekts

Bezüglich der Bedeutung neurologischer und neurotoxikologischer Forschung vor allem beim Menschen sei auf die Darstellung des Gesamtantrags verwiesen. Die enge Verknüpfung einer umweltbedingten Exposition und einer potentiellen Schädigung von Mensch und Tier wird aus allen Reviews deutlich (Andersen et al. 2000, Claudio et al. 2000, Grandjean & Landrigan 2006). Fische stellen nach wie vor das klassische Modellsystem für Wirbeltiere in aquatischen Ökosystemen dar und sind daher nicht nur aus ökotoxikologischer, sondern auch aus toxikologischer Sicht von besonderem Interesse bei der Bewertung von Oberflächen- und Trinkwasser. Daher haben Fische bei der Routineüberwachung von Abwässern und der Erfassung akut und chronisch toxischer und teratogener Effekte von Gewässereinleitungen und Wasserinhaltsstoffen weltweit einen festen Platz in nationalen und internationalen Regelwerken. Darüber hinaus gewinnen Fische als niedere Wirbeltiere seit einigen Jahren eine immer größere Bedeutung als Alternativmodelle zu klassischen Säugetiermodellen. Insbesondere der Embryo des Zebrabärblings (Danio rerio) hat sich in zahlreichen Studien als vielversprechendes Modell für die Vorhersage von Toxizität und Teratogenität von Chemikalien bei Säugetieren inklusive des Menschen erwiesen (DeMicco et al. 2010, Ducharme et al. 2015, Flentke et al. 2014, Guo et al. 2015, Lee & Freeman 2014, Lee et al. 2013, Nishimura et al. 2015, Parng et al. 2007, Roy et al. 2016, Selderslaghs et al. 2013, Ton & Willett 205).



Abb. 1: Spezifische Acetylcholinesteraseaktivität sowie vereinigte akute und sublethale Effekte von Paraoxon-methyl in Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) nach 96 Std. Belastung (Kais et al. 2015).

Beispielsweise lassen sich cardiotoxische Effekte am menschlichen Herzen mit 80 %iger Sicherheit über Experimente mit Zebrabärblingsembryonen vorhersagen (Milan et al. 2003); analoge Schlussfolgerungen wurden für entwicklungstoxische, hepatotoxische und vor allem auch neurotoxische Wirkungen gezogen (Brannen et al. 2010, Peal et al. 2010, Taylor et al. 2010, Selderslaghs et al. 2009, 2010, 2013).



Abb. 2: *In vivo*-Darstellung von Neuromasten der Kopfregion eines 96 h alten Embryos des Zebrabärblings (*Danio rerio*): 30 min Doppelfärbung mit 0.005 % DASPEI (2-[*p*-(Dimethylamino)-styryl]ethyl-pyridiniumiodit in 0,5 % DMSO (pink) und 0.1 % DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 30 min, blau) in Kunstwasser; eingebettet in 1 % Low-melting Agarose ergänzt mit 0.016 % MS222 zur Anästhesie. Unter den potentiellen Positivkontrollen (Kupfersulfat, Neomycin, Paraoxon-methyl) führt eine 96 h Belastung mit Kupfersulfat zu der stärksten Verringerung der Fluoreszenzfärbung der Neuromasten (Quelle: Abschlussbericht ToxBox-Teilprojekt Universität Heidelberg).

Grade of neuromast damage				
	0	1	2	3
P3	2		÷.	
P2	*	- Je		
P1			10	
MI2	×		30	
MI1	÷.		4	140
02		12		
M2	S.	S.	-	
103	-	-		ð
102		3		

Abb. 3: Referenzbilder zum Scoring der Schädigung ausgewählter Neuromasten des Zebrabärblings (Danio rerio) nach Belastung mit neurotoxischen Substanzen: 0 - unveränderte Kontrolle; 1 - geringfügige Schädigung (verringerte Anfärbung der Mitochondrien und/oder verringerte Anzahl der Haarzellen); 2 – starke Schädigung (Mitochondrien nur schwach gefärbt und/oder starke Reduktion der Anzahl der Haarzellen); 3 sehr starke Schädigung (Mitochondrien und Haarzellen kaum nachweisbar; Stengel et al. 2017).

Im RISKWA-Vorläuferprojekt Tox-Box konnte prinzipiell gezeigt werden konnte, dass im Embryo des etablierten Modellorganismus Zebrabärbling (*Danio rerio*) sowohl hochspezifische Biomarker (z.B. Hemmung der Acetylcholinesterase; Kais et al. 2015; vgl. Abb. 1) als auch Veränderungen in zentralen Sinnesleistungen wie Seitenlinienorgan, optischem und olfaktorischen Sinn dazu verwendet werden können, um neurotoxische Substanzen im Wasser zumindest semiquantitativ nachzuweisen (Braunbeck et al. 2015; vgl. Abb. 2, 3).

4. Grundsätzliche Überlegungen zu den Methoden

So weit möglich, sollten die Untersuchungen ausschließlich an Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) durchgeführt werden, da diese nach der derzeitigen EU-Tierschutzverordnung (EU 2010) nicht als geschützte Lebensstadien betrachtet werden (Strähle 2012). Des Weiteren war es erklärtes Ziel des Teilprojekts an der Universität Heidelberg, Verfahren zu entwickeln, die als einfache, schnelle und kostengünstige Methoden auch im Screening eingesetzt werden können. So sollten die Untersuchungen zur neurotoxischen Wirkung auf Seitenlinie, Nase, Auge und Synapsen (Acetylcholinesterase) ausschließlich im Embryo erfolgen. Als Techniken kamen hierzu Morphologie (Fischembryotest), Immunfluoreszenz und konfokale Laser Scanning-Mikroskopie zur Anwendung (vgl. auch Abschlussbericht ToxBox). Auch der *Photomotor Response*-Assay kann bereits mit Embryonalstadien durchgeführt werden. Der in diesem Projekt entwickelte *Novel tank*-Test wird jedoch an wenigstens juvenile Stadien durchgeführt und erfordert daher eine tierschutzrechtliche Genehmigung.

Die Untersuchungen zur Populationsrelevanz orientieren sich bezüglich der populationsrelevanten Parameter Wachstum und Überlebensrate an der OECD TG 210 (Early Life-Stage-Tests); insbesondere Reproduktionstests können naturgemäß nur in adulten Entwicklungsstadien untersucht werden. Für die Tierversuche wurde beim Regierungspräsidium Karlsruhe ein entsprechender Antrag gestellt und genehmigt (AZ 35-9185.81 /G-259/19).

5. Ergebnisse in NeuroBox-Teilprojekt 2: "Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für den Menschen"

Die in Tabelle 1 zusammengestellte Auswahl an Substanzen, die als bekannte Neurotoxine gelten, wurde im Projektverbund getroffen und sollte weitestgehend von allen Teilprojekten untersucht werden.

Name	Zuordnung	Wirkung
Diazinon	Organophosphat	Acetylcholinesterase
Diazinon-oxon	Organophosphat (Transformationsprodukt)	Acetylcholinesterase
Dichlorvos	Organophosphat	Acetylcholinesterase
Paraoxon-methyl	Organophosphat (Transformationsprodukt)	Acetylcholinesterase
Aldicarb	Carbamat	Acetylcholinesterase
Diazepam	Benzodiazepin	GABA-Rezeptor
Carbamazepin	Dibenzazepine	Blockade von Natriumka- nälen
Imidacloprid	Neonikotinoid	Acetylcholinesterase
Nonylphenol	Nonylphenolethoxylate (NPEO)	Endokrine Wirkung
TDCiPP (Tris(1,3- dichloro-2-propyl) phosphat)	Organophosphat	Acetylcholinesterase, En- dokrine Wirkung
Venlafaxinhydroch- lorid	Phenylethylamin-Derivat	Serotonin-/Noradrenalin- aufnahme

 Tabelle 1: Kernsubstanzen des Projektverbundes NeuroBox

In hier beschriebenen Teilprojekt wurden der Liste außerdem Kobaltchlorid, Fluoxetin-Hydrochlorid und Mebendazol als Positivkontrollen für spezifische Tests hinzugefügt.

5.1 AP 1.1: Ermittlung der akut toxischen Wirkung von Substanzen mit Hilfe des Fischembryotests (OECD TG 236)

Zur Ermittlung der akut toxischen Wirkung von Substanzen, die aus Experimenten mit Säugetieren als klassische Neurotoxine gelten, wurde zunächst der klassische Fischembryotest (OECD TG 236) durchgeführt. Hierbei werden nach 96stündiger Belastung der LC₅₀- und der EC₁₀-Wert der zu testenden Substanz bestimmt. Anschließend wurden typische neurotoxikologische Endpunkte (Acetylcholinesterase, Neuromasten-Degeneration, Störungen in olfaktorischem Epithel und Retina) untersucht. Für die Untersuchung der neurotoxikologischen Endpunkte wurden Konzentrationen unterhalb der jeweiligen EC₁₀-Werte eingesetzt, um eine sichere Trennung von Neurotoxizität und systemischer (allgemeiner) Toxizität der getesteten Substanz vornehmen zu können. Der Fischembryotest wurde mit allen Projektsubstanzen durchgeführt. Für Imidacloprid konnte in dem getesteten Konzentrationsbereich (höchste Konzentration: 500 mg/L) keine Toxizität festgestellt werden. Für Aldicarb, Dichlorvos, Paraoxon-methyl und Nonylphenol lagen laborintern bereits Daten vor. Diazepam konnte in Heidelberg aufgrund einer fehlenden Genehmigung für die Handhabung von Betäubungsmitteln nicht getestet werden. Die errechneten Werte nach einer Belastung über 96 h sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Weitergearbeitet wurde mit den ermittelten EC₁₀-Werten, und nur signifikante Effekte im Bereich \leq EC₁₀ wurden als positiv gewertet.

Substanz	EC ₁₀ [mg/L]	EC₅₀ [mg/L]	LC₅₀ [mg/L]
Diazinon	2,27 ± 0,23	4,25 ± 0,41	7,85 ± 1,43
Diazinon-oxon	1,28 ± 0,34	$2,03 \pm 0,15$	-
Carbamazepin	41	67	-
Imidacoprid	> 500	-	-
Mebendazol	0,053 ± 0,005	$0,092 \pm 0,004$	0,156 ± 0,01
Aldicarb	0,078	0,13	-
Dichlorvos	2,83 ± 0,53	$4,65 \pm 0,54$	8,1 ± 0,49
Paraoxon-methyl	2	-	-
Nonylphenol	0,14 ± 0,06	$0,28 \pm 0,09$	$1,5 \pm 0,4$
Diazepam	_	-	-
Venlafaxinehydrochlorid	309 ± 20	476 ± 14	-
TDCiPP (Tris(1,3-dich- loro-2-propyl) phosphat)	0,71 ± 0,27	1,01 ± 0,05	2,27 ± 0,41

Tabelle 2: Letale und subletale Effektkonzentrationen ausgewählter Kernsubstanzen nach 96 Stunden Belastung. Daten als Mittelwerte \pm SE aus \geq 3 unabhängigen Replikaten.

5.2 AP 1.2: Untersuchung typischer neurotoxikologischer Endpunkte

5.2.1 Hemmung der Acetylcholinesterase

Der Acetylcholinesterase-Assay (Ellman et al. 1961) ist eine photometrische Methode zur Ermittlung der Acetylcholinesteraseaktivität und wurde von Küster (Küster 2005) bzw. Kais et al. (2015) für die Verwendung von Embryonen des Zebrabärblings und die Messung in Mikrotiterplatten angepasst (Kais et al. 2015) und im ToxBox-Projekt für die Testbatterie für Neurotoxizität optimiert (Grummt et al. 2018; Stengel et al. 2018). Mit dem im Fischembryotest (OECD TG 236) ermittelten EC₁₀-Wert der getesteten Substanz (Tabelle 2) als höchste Ausgangskonzentration wurde im Anschluss die Aktivität der Acetylcholinesterase gemessen.



Abb. 4: Hemmung der Acetylcholinesterase in Embryonen des Zebrabärbling (Danio rerio) nach 96 h. Dar-gestellt ist die Aktivität der Acetylcholinesterase nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von Aldicarb (A), Carbamazepin (B), Diazinon (C), Diazinon-oxon (D), TDCiPP (E) und Venlafaxin-hydrochlorid (F) normalisiert auf die Negativkontrolle [% von NC]. Als Negativkontrolle wurde Kunst-wasser verwendet als Lösungsmittelkontrolle (0,1% (C, D), 0,4% (B)) DMSO und als Positivkontrolle Paraoxon-methyl (2 mg/L). Die Buchstaben a, b und c stehen für Durchlauf 1, 2 und 3 und wurden in jedem Durchlauf statistisch (ANOVA) gesondert getestet.

Der Acetylcholinesterase-Assay wurde mit den Substanzen Aldicarb, Carbamazepin, Diazinon, Diazinon-oxon, TDCiPP und Venlafaxinhydrochlid erfolgreich durchgeführt (Abb. 4, 5). Diazinon und das Transformationsprodukt Diazinon-oxon hemmten die Aktivität der Acetylcholinesterase in Konzentrationen unterhalb des EC₁₀-Wertes. Für Carbamazepin, TDCiPP und Venlafaxin-Hydrochlorid war keine signifikante Hemmung feststellbar. Aldicarb hat die Aktivität der Acetylcholinesterase in einem von drei Replikaten im EC₁₀-Bereich gehemmt, bei der nächsthöheren Konzentration (> EC₁₀) war allerdings in allen drei Replikaten eine Hemmung vorhanden.



Abb. 5: Hemmung der Acetylcholinesterase in Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) nach 96 h. Dargestellt ist die Aktivität der Acetylcholinesterase nach Belastung mit der jeweiligen EC₁₀ Konzentration von Aldicarb, Carbamazepin, Diazinon, Diazinon-oxon, TDCiPP und Venlafaxin-Hydrochlorid normalisiert auf die Negativkontrolle (% of negative control). Als Negativkontrolle wurde Kunstwasser verwendet; als Positivkontrolle diente Paraoxon-methyl (2 mg/L). Die Buchstaben a, b und c stehen für Durchlauf 1, 2 und 3 und wurden in jedem Durchlauf statistisch (One-way ANOVA) gesondert getestet.

5.2.2 Neuromasten-Assay

Der Neuromasten-Assay wurde im ToxBox Projekt von Stengel et al. (2018) weiterentwickelt und optimiert. Die Störung der Neuromasten ist ein wichtiger neurotoxischer Endpunkt, da die Sinneszellen der Neuromasten nicht nur homolog zu den Haarzellen des menschlichen Innenohrs sind und der Assay dadurch auch zur Vorhersage einer potenziellen Schädigung des Gehörsinns bei Säugern bzw. dem Menschen genutzt werden kann, sondern auch, weil die Neuromasten aus ökologischer Sicht für Fische überlebensnotwendig sind.

Neuromasten bestehen aus Haarsinneszellen, umgeben von Stütz- und Mantelzellen, und die Gesamtheit der Neuromasten bildet das Seitenliniensystem von aquatischen Wirbeltieren (Raible and Kruse 2000) (Abb. 6). Bei dem Assay handelt es sich um eine Doppelfärbung mit einfachen Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und DASPEI (2-(4-(dimethylamino)styryl)-*N*-Ethylpyridiniumiodid)), welche die Zellkerne der Neuromasten und zelluläre Mitochondrien anfärben. Hierbei kann eine Schädigung der Neuromasten nach einer Belastung mit einer neurotoxischen Substanz durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität sichtbar gemacht werden. Jeder Neuromast wird mit Hilfe des Scoring-Systems, in Abb. 7 beispielhaft für den Neuromasten P3 dargestellt und bewertet; anschließend werden die Fluoreszenzwerte aller Neuromasten berechnet.



Abb. 6: Lokalisation von Neuromasten im anterioren (rot) und posterioren (blau) Seitenliniensystem vom Zebrabärbling (*Danio rerio*) nach Metcalfe et al. (1985) sowie Raible und Kruse (2000). Die Neuromasten IO2, IO3, O2, M2, MI1, MI2, P1, P2 und P3 werden im Neuromasten-Assay untersucht.



Abb. 7: Scoring-System zur Bewertung der Schädigung von ausgewählten Neuromasten. In diesem Beispiel ist der Neuromast P3 dargestellt. 0 - unveränderte Kontrolle: alle Haarzellen gut gefärbt; 1 - leichte Schädigung: reduzierte Färbeintensität der Mitochondrien und/oder weniger Haarzellen; 2 - starke Schädigung: Mitochondrien nur schwach gefärbt und/oder stark reduzierte Anzahl von Haarzellen; 3 - sehr starke Schädigung: Mitochondrien und Haarzellen kaum nachweisbar.

Ziel im Arbeitspaket 1.2 war es, die Kernsubstanzen (Tabelle 1) auf ihr neurotoxisches Potential auf das Seitenliniensystem zu testen. Es wurden die Substanzen Aldicarb, Diazinon, Diazinon-oxon, Paraoxon-methyl und TDCiPP getestet. Keine der getesteten Substanzen erwies sich für Neuromasten als schädlich. Dichlorvos und Nonyphenol wurden in einer früheren Studie getestet (Stengel et al. 2017), in der für Dichlorvos ein schädigender Effekt auf das Seitenliniensystem nachgewiesen wurde. Carbamazepin und Venlafaxinhydrochlorid wurden nicht getestet.

5.2.3 Schädigungen in der Retina

Die Retina sowie die anderen Sinnesorgane (Seitenliniensystem und olfaktorisches System) wurden als neurotoxische Endpunkte gewählt, da sie für das Überleben der Tiere von immenser Bedeutung sind und weil ca. 50 % der neurotoxisch wirkenden Substanzen in irgendeiner Weise einen schädigenden Effekt auf Sinnesorgane haben sollen (Croft and Sheets 1989). In Kombination mit dem Acetylcholinesterase-Assay sollte es daher möglich sein, einen großen Teil von Neurotoxinen zu identifizieren. Die Netzhaut des Zebrabärblings (Abb. 8 nach Gramage et al. 2014) ist der von anderen Wirbeltieren inklusive Säugetieren in Aufbau und Funktion sehr ähnlich, und aufgrund ihrer präzisen Schichtung und einer überschaubaren Anzahl von Zelltypen wurde die strukturelle Integrität gewählt, um toxikologische Schäden zu erkennen.

Watanabe et al. (2010) haben in ihrer Studie vier Cumarinderivate identifiziert, welche es ermöglichen, Zellen der Retina *in vivo* anzufärben. Durch diesen Färbeprozess können die verschiedenen Schichten der Retina relativ einfach dargestellt werden. Diese Methode wurde speziell für chemische und genetische Screenings im Zebrabärblingsembryo entwickelt, um Substanzen bzw. Gene zu identifizieren, welche sich kritisch auf die korrekte Entwicklung der Retina auswirken. Die Methode von Watanabe et al. (2010) wurde mit dem Farbstoff 3-(2-Benzothiazolyl-7-(diethylamino)-cumarin (BTDEC), auch Cumarin 6 genannt, weiter optimiert. In Abb. 9 und 10 ist ein Beispiel einer Färbung der Retina eines Zebrabärblingsembryos (ventrale Ansicht) im Alter von 72 h zu sehen.

Für die Entwicklung eines aussagekräftigen Schnelltests, wird mindestens eine Substanz benötigt, welche die Struktur der Retina in Konzentrationsbereichen von EC₁₀ und niedriger schädigt und somit als Positivkontrolle dienen kann.

In Studien mit dem Zebrabärblingsembryo wurde gezeigt, dass eine Dauerbelastung mit Mebendazol, einem Anthelminthikum, die korrekte Entwicklung der Retina verhindert (Watanabe 2010). Durch eigene Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Mebendazol auch im EC₁₀-Bereich erkennbare Veränderungen in der Schichtung der Netzhaut hervorruft. Das im Heidelberger Labor entwickelte Protokoll zur *In vivo*-Färbung der Retina mit Cumarin 6 ist in Tabelle 3 zusammengefasst.



Abb. 8: Aufbau der Retina (aus Gramage et al. 2014). A: Querschnitt durch die Retina eines adulten Zebrabärblings (*Danio rerio*), der die zellulären und synaptischen Schichten in der Retina zeigt (Balken = 25 μm). B: Darstellung der zellulären Zusammensetzung der verschiedenen Schichten in der Retina (6 neuronale Zelltypen und 2 unterstützende Zelltypen (Müller Glia, Pigmentepithel der Retina)).



Abb. 9: *In vivo*-Färbung der Retina in Embryonen des Zebrabärbling (*Danio rerio*) mit Hilfe des Farbstoffs Cumarin 6 nach 96 h. Auswertung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem 20x Tauchobjektiv. PCL: photoreceptor layer; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer.



Abb. 10: *In vivo*-Färbung der Retina in Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) mit Hilfe des Farbstoffs Cumarin 6 nach 72 h. Auswertung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem 40x Tauchobjektiv. ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; ON: optic nerve; Le: lens.

Chemikalien	 3-(2-Benzothiazolyl-7-(diethylamino)-cumarin (BTDEC) = Cumarin 6 <i>N</i>-Phenylthio 'harnstoff (PTU)
Stammlösungen	 Färbung: 1 mg Coumarin 6 in 1 ml DMSO (100%) 100 µM PTU Lösung: 15,2 mg PTU in 1 l Kunstwasser (KW)
Hemmung der Pig- mentierung	 Ab 24 h Aufzucht der Embryonen in 100 µM PTU Lösung bis zum ge- wünschten Alter
Arbeitsabfolge	• 3 x 10 min Waschen mit KW
	 Färben: 30 min mit Coumarin 6 (Färbelösung: 1 µg Stocklösung pro ml KW)
	• 3 x 10 min Waschen mit KW
	Betäuben: 0,016% Tricain für 5 min
	Einbetten: Low Melting Agarose (LMA)
	 Untersuchung der Embryonen am Confocal (20 x Tauchobjektiv) mit grünem Laser

Tabelle 3: Standard Operation Procedure zur *In vivo*-Färbung der Retina mit Cumarin 6

Mit Hilfe von Mebendazol wurde ein Schema zur Bewertung morphologischer Veränderungen in der Retina entwickelt (Abb. 11). Die Auswirkungen von Mebendazol auf die Retina wurden nach 72 und 96 Stunden Belastung in drei Durchläufen mit jeweils zehn Embryonen pro Konzentration untersucht. Der Grad der Schädigung nahm mit steigender Konzentration zu (Abb. 12). Signifikante Unterschiede im EC₁₀-Bereich waren jedoch nur in einem Durchlauf nach 96-stündiger Belastung zu sehen (Abb. 12, rechts). Das neu entwickelte Bewertungsschema eignet sich hervorragend, um kleinste Schäden in der Struktur der Retina zu erkennen, die Art der Auswertung ist jedoch subjektiv und kann von Person zu Person variieren. Auch ist der Grad der Schädigung sehr variabel, weshalb trotz sehr sensitiver Erfassung (kleinste Schäden werden erfasst) die Unterschiede im EC₁₀-Bereich und niedriger statistisch nicht signifikant waren.



Normalzustand

3



Geringer Schaden

1

2

Mittlerer Schaden



Starker Schaden

Abb. 11: Bewertungsschema für die Beurteilung von strukturellen Schäden in der Retina ausgewählter Zebrabärblingsembryos (96 h). 0 – normaler Zustand der Retina; 1 – geringer Schaden: einzelne Unregelmäßigkeiten im Aufbau der Retina sichtbar; 2 – mittlerer Schaden: mehrere Unregelmäßigkeiten im Aufbau der Retina sichtbar; 3 – starker Schaden: deutliche Veränderungen im Aufbau der Retina sichtbar.



Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 21 von 69

Um dem entgegenzuwirken, wurden auch andere, "objektivere" Methoden zur Auswertung ausprobiert (Abb. 13). Es wurden der Durchmesser, die Fläche und der Umfang der inneren plexiformen Schicht (IPS) mit Hilfe von dem Open Source-Programm ImageJ (https://imagej.net/) gemessen und anschließend ausgewertet. Nur die Ergebnisse der Flächenmessung werden dargestellt, da die Messungen des Durchmessers und der Fläche der IPS ähnliche Ergebnisse lieferten. Die Messung des Umfangs der IPS wies keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen auf. Die Fläche der IPS nahm im EC₁₀-Bereich signifikant ab (Abb. 14). reagierten 72 Stunden alte Embryonen empfindlicher auf Belastung mit Mebendazol als 96 Stunden alte.



Abb. 13: Verschiedene Auswertmethoden mit der Software ImageJ. Der Durchmesser (links), die Fläche (Mitte) und der Umfang (rechts) der inneren plexiformen Schicht (IPL) wurden mit Hilfe von ImageJ vermessen. Der Durchmesser der IPL wird als Mittelwert von jeweils 10 Messstellen angegeben.

Die Messungen mit ImageJ sind eine gute Ergänzung zu dem oben vorgestellten Bewertungsschema. Nicht nur ist die Auswertmethode weniger variabel, sondern die Auswertung kann durch ein funktionierendes Makro auch voll automatisiert werden.

Nach der Entwicklung der Methode wurde der Retina-Assay mit allen Projektsubstanzen sowohl nach 72 als auch nach 96 h Belastung durchgeführt. Von den Modellneurotoxinen hatten Dichlorvos, Nonylphenol, Paraoxon-Methyl, TDCiPP und Venlafaxinhydrochlorid im Bereich ≤ EC₁₀ einen signifikanten Effekt auf die Fläche der inneren plexiformen Schicht (Details siehe Anhang 1). Bei Nonylphenol und TDCiPP war es jedoch nur ein einziger Durchlauf positiv und es konnte kein klarer Trend detektiert werden. TDCiPP – eine damit "falsch-negative" Substanz – beeinflusst jedoch die Augenentwicklung durchaus, auch wenn das aus der Messung der Fläche der IPS nicht hervorging: Bei ca. 20 % der Embryonen entwickelte sich nur ein Auge (Abb. 16). Das Auge, welches sich entwickelte, wies aber eine korrekte Entwicklung auf. Die Ergebnisse von Dichlorvos, Paraoxon-methyl und Venlafaxin-hydrochlorid sind in Abb. 10 zusammengefasst.



Seite 23 von 69

Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)







Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 26 von 69



Abb. 4: Zebrabärblingsembryo nach TDCiPP Belastung zum Zeitpunkt 72 h. Nur ein Auge hat sich entwickelt.

Mit ausgewählten zusätzlichen Substanzen (Tab. 4) wurde ein weiteres Screening durchgeführt, um die IPS als nützlichen Endpunkt für den Nachweis neurotoxischer Substanzen weiter zu untermauern.

Name	Zuordnung
Acetominophen	Nichtopioides Analgetikum
Cadmiumchlorid	Chemische Verbindung des Cadmiums
Cobaltchlorid	Chemische Verbindung von Cobalt und Chlor
Diethylaminobenzaldehyd	Benzaldehyd-Derivat
Ethanol	Alkohol
Kupfersulfat	Kupfersalz der Schwefelsäure
Methanol	Alkohol
Propylthiouracil	Thyreostatikum

Tabelle 4: Ergänzende Testsubstanzen

Für diese Substanzen wurde bereits gezeigt, dass sie die richtige Augenentwicklung bei Fischen (Chow et al. 2009) oder beim Menschen (Stratton 1996) negativ beeinflussen. So kann Ethanol bei zu hohem Konsum währen der Schwangerschaft bei Neugeborenen einen Mikrophthalmus verursachen (Stratton 1996), 4-Diethylaminobenzaldehyd (DEBA) greift in den Retinsäure-Signalweg ein (Luo et al. 2015) und kann einen Vitamin-A-Mangel verursachen, was bei Kindern in Entwicklungsländern zur Erblindung führen kann. Auch bei Belastung mit Cadmiumchlorid wurde bei Zebrafischembryonen Blindheit nachgewiesen (Chow et al. 2008). Die Effekte aus den genannten Studien konnten mit den meisten Substanzen repliziert werden, was die gute Eignung des Retina-Assays für neurotoxische Screenings belegt.

Die Ergebnisse beider Screenings zeigen, dass die neu entwickelte Methode empfindlich genug ist, um Veränderungen bei niedrigen Konzentrationen ($\leq EC_{10}$) zu detektieren. Effekte sind durchaus nicht bei allen getesteten Substanzen festzustellen, was die Spezifität des Retina-Assays dokumentiert. Die Integrität der Retina von Zebrafischembryonen ist damit ein vielversprechender Endpunkt für die Bewertung neurotoxischer Effekte bei Fischen.

5.2.4 Schädigungen im olfaktorischen Epithel

Ein weiteres wichtiges Sinnesorgan und ein idealer Angriffspunkt für diverse Chemikalien stellt das Riechsystem dar (Tierney et al. 2011). Es wird von zwei Hauptstrukturen gebildet: einem Paar peripherer Riechorgane oder Rosetten, die sich in der Nasenhöhle befinden und über die Axone der Sinnesneuronen des Riechepithels (OSN) mit den Riechkolben verbunden sind (Abb. 17; Byrd and Brunjes 1995).



Abb. 17: A-D: Verschiedene Ebenen des olfaktorischen Epithels von Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*). D: Dendrit, DE: dendritische Endigung, S: Soma, Z: Zilien, ZU: Zellumrandung. E: Messung der Fluoreszenzintensität mit der freien Software ImageJ.

Die Axone der OSN bilden in den Riechkolben diskrete Strukturen, die sogenannten Glomeruli, wo sie Synapsen mit bulbären Mitralzellen ausbilden. Die Mitralzellen leiten die Signale, die durch Geruchsmoleküle oder Geruchsstoffe ausgelöst werden, dann in olfaktorisch verarbeitende Hirnareale weiter (Braubach et al. 2012, Fuller et al. 2006).

Farbstoff	Rhodamin-123
Stammlösung	• 3,8 mg Rhodamin-123 in 1 ml DMSO (100%)
Arbeitsabfolge • 3 x 5 min Waschen mit KW	
 Färben: 2,5 h mit Rhodamin-123 (Färbelösung: 15 μg sung pro ml KW) 	
• 3 x 5 min Waschen mit KW	
Betäuben: 0,016% Tricain für 5 min	
	Einbettung in Low Melting Agarose (LMA)
	 Untersuchung der Embryonen am konfokalen Laserscanning- mikroskop (60 x Tauchobjektiv) mit grünem Laser

Tabelle 5: Protokoll zur In vivo-Färbung der Mitochondrien im Riechepithel mit Rhodamin-123

Zur Untersuchung des Riechsystems wurde eine Methode entwickelt, welche ähnlich wie der Neuromasten-Assay funktioniert: Durch Veränderung eines Fluoreszenzsignals wurde eine Schädigung oder Überaktivierung der Riechsinneszellen nach Belastung mit einer neurotoxischen Substanz sichtbar gemacht. Hierbei wurden die Mitochondrien der Sinnesneuronen im Riechepithel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 angefärbt (Tab. 5). Anschließend wurden Bilder der Riechgrube aufgenommen und mit einem Scoring-System (Tab. 6) bewertet.

Tabelle 6: Scoring-System zur Bewertung der Fluoreszenzintensität des olfaktorischenEpithels (NK = Negativkontrolle).

Wert	Bedeutung
+2	Deutliche Fluoreszenzzunahme im Vergleich zur NK
+1	Leichte Fluoreszenzzunahme im Vergleich zur NK
0	Negativkontrolle
-1	Leichte Fluoreszenzabnahme im Vergleich zur NK
-2	Deutliche Fluoreszenzabnahme im Vergleich zur NK

Kobaltchlorid ist bekannt dafür, das olfaktorische System zu schädigen (Butler et al. 2016) und wurde mit dieser Methode ebenfalls als positive Substanz identifiziert. In Abb. 18 ist das Scoring für Kobaltchlorid nach Dauerbelastung zu dem Zeitpunkt 96 h dargestellt. Die Scores wurden nach bestem Wissen und Gewissen vergeben, dennoch ist dies eine relativ subjektive Auswertmethode. Um dem entgegenzuwirken, wurde die Fluoreszenzintensität auch mit Hilfe von der Software ImageJ gemessen (Abb. 18E).

Die Exposition der Zebrafisch-Embryonen mit Kobaltchlorid führte bei beiden Auswertmethoden zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität in Konzentrationsbereichen vom EC₁₀ und darunter (Abb. 19). Hier ist nur die direkte Messung mit Hilfe von ImageJ dargestellt.

Abb. 18: Olfaktorische Epithelien der 96 h alten Zebrabärblingsembryonen (Danio rerio) nach Dauerbelastung mit Kobaltchlorid mit unterschiedlichen Testkonzentrationen. Die vergebenen Scores der fünfstufigen Bewertungsskala sind als rote Zahlen angegeben. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration von Kobaltchlorid ist zu sehen. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle mit 0,8 mg/L Kupfersulfat.



Seite 31 von 69

Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)



Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 32 von 69

Nach erfolgreicher Entwicklung des Olfaktorischen-Epithelium-Assays wurden die Projektsubstanzen getestet. Ein signifikanter Effekt wurde in einem Replikat von Carbamazepin, Diazinon-Oxon, Paraoxon-Methyl, TDCiPP und Venlafaxin-Hydrochlorid festgestellt, während zwei Replikate von Diazinon und Dichlorvos positiv waren. Nach der Exposition mit Aldicarb und Nonylphenol wurde kein Effekt festgestellt.



Abb. 5: Fluoreszenzintensität des olfaktorischen Epithels von 96 h alten Zebrabärblingsembryonen nach Belastung mit verschiedenen Konzentrationen von Kobaltchlorid. Es wurden drei unabhängige Replikate durchgeführt, und der signifikante Unterschied ist für jedes Replikat einzeln markiert (One-way ANOVA, Dunn's-Test). Kupfersulfat (0,8 mg/L, dunkelgraue Box) diente als Positivkontrolle und Kunstwasser als Negativkontrolle (weiße Box).

Der Olfaktorische-Epithelium-Assay ist, zusammen mit den anderen Assays, eine Methode mit hohem Potential zur Identifizierung neurotoxischer Substanzen.

5.3 AP 3: Langzeitbelastung von Zebrabärblingen mit neurotoxischen Substanzen

Die zentrale Frage des dritten Arbeitspakets lautete, inwieweit sich neurotoxische Effekte in populationsrelevanten Parametern wie Wachstum. Überleben, Entwicklung und Reproduktion manifestieren. Besonderes Augenmerk wurde auf potenziell überlebenswichtige Verhaltensmuster gelegt, die sich im Zuge eines erweiterten Early Life-Stage-Tests ohne den Einsatz zusätzlicher Versuchstiere ermitteln ließen.

Die hierfür nötigen Anpassungen des etablierten Testprotokolls des Early Life-Stage-Test (ELS)s (OECD TG 210; OECD 2013) wurde mit Fluoxetin als "Positivsubstanz" entwickelt, worauf eingehende Tests mit drei Kernsubstanzen des Verbundprojekts folgten. Zur Vermeidung unspezifischer akuter Toxizität lagen sämtliche Belastungen – teils deutlich – unterhalb der 12-Tages-EC₁₀, die zu diesem Zweck in Vorversuchen ausgehend von 96-Stunden-Werten aus AP 1 näherungsweise ermittelt worden war.

Die Befunde aus den Verhaltenstests sind in Tab. 7 zusammengefasst. Eine Beschreibung der Verfahrensweise für die Verhaltensexperimente findet sich in Anhang 2.

Substanz	Test	Zeit	LOEC	Trend
	<i>Novel tank</i> (obere Hälfte)	4 min	5 μg/L†	Ť
Fluoxetin	Predator response (Distanz)	3 min	40 µg/L	Ť
	Predator response (Schwarm)	1 min	40 µg/L	\downarrow
Paraoyon methyl	Novel tank (obere Hälfte)	4 min	0,5 mg/L	↑
Falaoxon-metry	Predator response (Schwarm)	1 min	0,5 mg/L	\downarrow
Carbamazepin	Novel tank (obere Hälfte)	4 min	10 mg/L	ſ
TDCPP	Predator response (Schwarm)	1 min	0,96 mg/L	(↑)

Tabelle 7: Zusammenfassung der Nachweisgrenzen für Effekte in den verschiedenen Verhaltenstests nach Langzeitbelastung

† geringste Testkonzentration (LOEC liegt vermutlich niedriger)

 \uparrow Zunahme; \downarrow Abnahme

5.3.1 Fluoxetin

Fluoxetin ist ein Antidepressivum aus der Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRI). Es bewirkt durch Hemmung des Proteins für Serotonin-Rücktransport (SERT) eine Anreicherung von Serotonin im synaptischen Spalt, von wo es normalerweise rasch nach der Ausschüttung rückresorbiert wird.

Die 96 h-EC₁₀ von Fluoxetin liegt bei etwa 7 mg/L (Zindler et al. 2019). Aufgrund einer stark steigenden akuten Toxizität nach längerer Belastung wurden jedoch wesentlich

geringere Konzentrationen von 0, 5, 10, 20 und 40 μ g/L für die chronische Belastung gewählt.

Am deutlichsten war der Effekt von Fluoxetin im *Novel tank-Test*, wo die Substanz deutlich die natürliche Unruhe als Reaktion auf unbekannte und damit potenziell gefährliche Umgebungen abschwächte (Abb. 20): Während unbelastete Kontrolltiere zunächst zum Beckenboden abtauchten und erst nach mehreren Minuten das gesamte Volumen ausnutzten, schwammen Fische unter Fluoxetin-Einfluss rasch in die obere Hälfte des Beobachtungsbeckens oder blieben teilweise selbst dann an der unsicheren Oberfläche, wenn sich ein Kescher im Wasser befand.

Im *Predator response-Test*, der das Feindvermeidungsverhalten untersuchen sollte. fiel die Wirkung von Fluoxetin weniger deutlich, aber dennoch messbar aus: Entgegen der anzunehmenden Angstminderung zeigten belastete Fische ein scheinbar vorsichtigeres Verhalten als die Vergleichsgruppen und hielten im Durchschnitt einen größeren Abstand zur Feindattrappe ein (Abb. 21). Dies kann jedoch möglicherweise durch das "Serotonin-Syndrom" erklärt werden, das zu einem Zustand genereller Erregung und Verwirrung führen soll (Stewart et al. 2013). Auch eine Schädigung der optischen Wahrnehmung könnte so ein Verhaltensmuster bedingen, sollten die Sinneseindrücke des Seitenlinienorgans unverändert auf den Fisch einwirken und die resultierende Diskrepanz zu einer erhöhten Alarmbereitschaft in Gegenwart der bewegten Attrappe führen.



Abb. 20: Normalisierte Präferenz für die obere Beckenhälfte bei Fischen in den ersten 120 Sekunden des *Novel Tank*-Tests mit Fluoxetin-Belastung (je 4 Replikate). Der Anteil des Schwarms im oberen Bereich wurde einmal pro Sekunde bestimmt und mit dem durchschnittlichen "Hintergrundverhalten" der jeweiligen Kontrollgruppe abgeglichen. Die Kästen beinhalten die Messwerte des 25. bis 75. Perzentils, die waagerechten Linien kennzeichnen den jeweiligen Median und die Balken schließen alle Werte des 10. bis 90. Perzentils ein. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA-on-ranks in Kombination mit Dunn's *post hoc*-Test).



Abb. 21: Abstand von Versuchsfischen zu einer Feindattrappe an der Seite des Beobachtungsbeckens (*Predator response-Test*; 16 A) während der ersten drei Minuten der Konfrontation unter Einfluss von 5-40 µg/L Fluoxetin bzw. in sauberem Wasser (NK, Negativkontrolle). Vier Replikate trugen jeweils einen durchschnittlichen *Distance score* pro Minute n = 4 x 3) als Maß des Vermeidungsverhaltens bei (16 B). Vier vertikale Zonen mit Werten von 1 (direkt beim Feind) bis 4 (größte Entfernung) wurden digital über das Videomaterial gelegt um das beobachtete Verhalten quantifizieren zu können. Die unterbrochene Linie repräsentiert den erwarteten Wert bei zufälligem Schwimmverhalten und die Kästen wurden analog zu Abb. 15 definiert. * p < 0.05 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVAon-Ranks in Kombination mit Dunn's *Post hoc*-Test).

Neben einem größeren Abstand zum Feind stellt auch eine verdichtete Schwarmformation eine mögliche Verteidigungsstrategie dar. Der Schwarmzusammenhalt (*Shoal coherence*) wurde anhand der gleichen Zonierung wie der Feindabstand näherungsweise ermittelt, indem die durchschnittlich eingenommenen Zonen im Verhältnis zur Zahl der Fische verglichen wurden. Eine dreidimensionale Analyse wäre auch hier optimal, aber technisch kaum möglich gewesen, und schon die vereinfachte Anschauungsweise wies auf Auswirkungen der Substanzbelastung hin.

Im Vergleich der verschiedenen Expositionsstufen zeichnete sich ein Trend zu einer konzentrationsabhängigen Verschlechterung des Schwarmzusammenhalts während der ersten Minute der Konfrontation ab (Abb. 22A). Bei höherer zeitlicher Auflösung wurden statistisch höchst signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe deutlich (Abb. 22B).

Auch diese Beobachtung könnte außer mit einer angstlösenden Wirkung ähnlich wie der veränderte Feindabstand alternativ mit einer verschlechterten optischen Wahrnehmung erklärt werden: werden die anderen Fische nicht zuverlässig als Artgenossen erkannt, ist natürlich eine geringere Annäherung zu erwarten.



Abb. 22: Schwarmzusammenhalt während der ersten Minute der Konfrontation mit einer Feinattrappe unter Kontrollbedingungen oder Fluoxetin-Einfluss. Ein geringerer Wert (weniger eingenommene Zonen pro Fisch) deutet auf einen dichteren Schwarm hin und umgekehrt. [A] Vergleich der Werte für den Zusammenhalt des Schwarms von Fischen mit verschiedenem Belastungshintergrund (ein Mittelwert pro Replikat; n = 4). [B] Detaillierte Analyse der Kontrollund Maximalbelastungsgruppen bei höherer zeitlicher Auflösung (Mittelwerte pro fünf Sekunden; n = 4 x 5). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA in Kombination mit Tukey-Test für paarweise Vergleiche).

Die klassischen Endpunkte des ELS (OECD TG 210) wurden durch die Belastung mit Fluoxetin nicht beeinflusst. Sowohl das Wachstum (Gesamtlänge & Gewicht) als auch die Überlebensrate während des 35 Tage dauernden Tests schienen sich nicht von der Negativkontrolle zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Im *Fish Short Term Reproduction Assay* (FSTRA) nach OECD TG 229 (OECD 2009) konnte ein Trend zur verringerten Eiablage unter Fluoxetin-Belastung im gleichen Konzentrationsbereich wie im ELS festgestellt werden. Für deutlichere Auswirkungen wären jedoch wohl höhere Dosen des Wirkstoffs nötig.

Für die Auswertung wurden täglich die befruchteten Eier jeder Gruppe ausgezählt und zum besseren Vergleich kumuliert (Abb. 23).



Abb. 23: Laicherfolg von Kontrollgruppen ("NK") und Fluoxetin-belasteten Zebrabärblingen (*Danio rerio*) aus je drei Replikaten à 10 Fischen (n=3). Befruchtete Eier wurden täglich gezählt und kumuliert. Die gestrichelte Linie markiert den Beginn der Chemikalienzugabe.

5.3.2 Paraoxon-methyl

Paraoxon-methyl ist ein Metabolit des ehemals weit verbreiteten Insektizids Parathion (E 605) aus der Gruppe der Organophosphate. Paraoxon-methyl führt durch irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) zu einer Dauererregung der Acetylcholinrezeptoren, was unter anderem Muskelzuckungen und Krämpfe zur Folge haben kann.

Da im verlängerten Embryotoxizitätstest auch hier eine mit der Belastungsdauer zunehmende Toxizität festgestellt wurde, wurde Paraoxon-methyl in Konzentrationen bis zu einem Viertel der 96 h-EC₁₀ von 2 mg/L eingesetzt (0,0625, 0,125, 0,25 und 0,5 mg/L).

Paraoxon-methyl rief einen angstlösenden Effekt im *Novel tank-Test* hervor, der im Vergleich mit der Positivkontrolle (40 µg/L Fluoxetin) weniger deutlich ausfiel aber dennoch klar von der Negativkontrolle zu unterscheiden war (Abb. 24).



Abb. 24: Normalisierte Präferenz für die obere Beckenhälfte bei Zebrabärblingen (*Danio rerio*) in den ersten vier Minuten (240 Sekunden) des *Novel Tank-Tests* unter Einfluss der höchsten eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Chemikalie. Die Kästen beinhalten die Messwerte des 25. bis 75. Perzentils, die waagerechten Linien kennzeichnen den jeweiligen Median und die Balken schließen alle Werte des 10. bis 90. Perzentils ein. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA-on-ranks in Kombination mit Dunn's Post hoc-Test).

Der Schwarmzusammenhalt war durch die Belastung gegenüber der Negativkontrolle verringert, es wurde also durchschnittlich ein größerer Bereich pro Fisch eingenommen (Abb. 25).



Abb. 25: Schwarmzusammenhalt 34 Tage alter Zebrabärblinge (*Danio rerio*; n = 3 Schwärme) unter Einfluss von Paraoxon-methyl während der jeweils ersten Minute von Konfrontationen mit einer Feindattrappe. Die dargestellten Punkte entsprechen jeweils dem Mittelwert der vorherigen 5 Sekunden, die Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One way-ANOVA in Kombination mit Tukey-Test für paarweise Vergleiche).

Im Early Life-Stage-Test wurde durch die verwendeten Konzentrationen von Paraoxon-methyl keine Veränderung der Wuchs- oder Überlebensraten verursacht.

5.3.3 TDCPP (Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphat)

TDCPP (Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphat) ist ein Organophosphat mit brandhemmenden Eigenschaften, das im Verdacht steht, ein endokriner Disruptor zu sein. Im Zusammenhang mit entwicklungsrelevanten Hormonen wird auch ein Einfluss auf die korrekte Ausbildung des Nervensystems vermutet.

Da im Vorversuch keine Zunahme der akuten Toxizität über die 96 h-EC10 ermittelt werden konnte, wurden Konzentrationen von 0,12, 0,24, 0,48 und 0,96 mg/L eingesetzt.

Das Verhalten TDCPP-belasteter Fische im *Novel Tank-Test* war nicht von dem der Kontrollgruppen zu unterscheiden (s. Abb. 24). Im Feindvermeidungsversuch gab es jedoch Hinweise auf einen leicht verstärkten Schwarmzusammenhalt (Abb. 26).


Abb. 26: Schwarmzusammenhalt 34 Tage alter Zebrabärblinge (*Danio rerio*; n = 4 Schwärme) unter TDCPP-Einfluss (0,96 mg/L) während der jeweils ersten Minute von Konfrontationen mit einer Feindattrappe. Die dargestellten Punkte entsprechen jeweils dem Mittelwert der vorherigen 5 Sekunden, die Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA in Ko9mbination mit Tukey-Test für paarweise Vergleiche).

Im Early Life-Stage-Test ergab sich ein leichter Trend zu einer konzentrationsabhängigen Wachstumshemmung im Vergleich zur Negativkontrolle. Durch die hohe Varianz der Messwerte, einschließlich jenen der Kontrollgruppe, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Eindruck zufällig entstanden ist.

5.3.4 Carbamazepin

Das Dibenzazepin Carbamazepin wird als Antikonvulsivum beispielsweise bei Epilepsie verschrieben. Seine Wirkung beruht vermutlich auf einer Blockade von Natriumkanälen der Nervenzellen, wodurch die Erregungsleitung vermindert wird.

Analog zu Paraoxon-methyl wurden Konzentrationen bis zu einem Viertel der 96 h-EC10 eingesetzt (1,25, 2,5, 5 und 10 mg/L), da in Vorversuchen leicht erhöhte akute Toxizität nach 12 Tagen festgestellt wurde.

Im *Novel Tank-Test* konnte nach längerfristiger Belastung mit Carbamazepin (10 mg/L) eine angstlösende Wirkung nachgewiesen werden, die deutlicher ausfiel als jene von Paraoxon-methyl (0,5 mg/L; vgl. Abb. 24).

Ähnlich wie TDCPP schien Carbamazepin im ELS zu einer leichten, konzentrationsabhängigen Wuchshemmung gegenüber der Negativkontrolle zu führen, was jedoch statistisch durch die hohe natürliche Varianz der Messwerte nicht zu sichern war.

5.4 AP 4: Veränderungen im Schwimmverhalten früher Entwicklungsstadien

Das Ziel von Arbeitspaket 4 lag darin, eine Korrelation oder sogar kausale Zusammenhänge von neurotoxischen Effekten und dem Schwimmverhalten von embryonalen und larvalen Entwicklungsstadien des Zebrabärblings aufzudecken. Anders als die konkreten Verhaltensmuster, die in AP 3 zum Einsatz kamen, ist die generelle Schwimmfähigkeit schon in den ersten Tagen und Wochen der Entwicklung zu beobachten und gut mit automatischer Videoanalyse auszuwerten.

Zur Beobachtung des Schwimmverhaltens wurden ein *Locomotor response*-Protokoll und die *DanioVision Observation Chamber* (Noldus, Niederlande) genutzt. Nach dem grundlegenden Schwimmverhalten wird in diesem Ansatz die Reaktion auf plötzliche Dunkelheit ausgewertet, die sich in gesunden Fischen durch erhöhte Aktivität auszeichnet. Gefilmt wurde unter konstantem Infrarotlicht, während in jedem Durchgang auf 10 Minuten sichtbares Licht eine ebenso lange Dunkelphase folgte. Die Fischlarven wurden nach Möglichkeit im Alter von 6 und 12 Tagen beobachtet, es kam allerdings um den zweiten Zeitpunkt herum immer wieder zu konzentrationsunabhängigen Verlusten (kritische Phase der Entwicklung bis ca. 14 dpf (days post fertilization)).

Endpunkte der Verhaltensbeobachtung waren Schwimmgeschwindigkeit (velocity, Abb. 23) und -distanz (distance, Abb. 29) sowie der zeitliche Anteil aktiver Phasen an der Gesamtdauer (percentage of activity, Abb. 27).

Nach einer Belastung mit 40 mg/L Carbamazepin zeigten 6 Tage alte Larven eine reduzierte Schwimmaktivität, gemessen am Anteil der aktiven Zeiten, in der Dunkelphase des Versuchs. Durchschnittlich etwa 20 % Aktivität macj Carbamazepin-Belastung standen Werten um die 50 % in der Negativ- und Lösungsmittelkontrolle gegenüber, ein statistisch höchst signifikanter Unterschied (p < 0,001; Abb. 27). Diese Konzentration entspricht dem 96 h-EC₁₀ und ist das Vierfache der höchsten Konzentration, die in den langfristigen Versuchen eingesetzt werden konnte (10 mg/L).

Der Effekt von Fluoxetin äußerte sich als konzentrationsabhängige Abnahme der grundlegenden Schwimmgeschwindigkeit im Licht (Abb. 28). Nach 6 Tagen konnte bereits eine signifikante Reduktion im Konzentrationsbereich der Langzeittests festgestellt werden (40 μ g/L), nach einer längeren Belastungsdauer von 12 Tagen schien dieser Endpunkt ähnlich sensitiv wie der *Novel tank-Test* (durchgängige Effekte ab 20 μ g/L und vereinzelt bei noch niedrigeren Konzentrationen bis hin zu 1,25 μ g/L). Allerdings kam es im 12-Tage-Versuch bei allen Versuchsgruppen inklusive der Negativ-kontrolle zu Verlusten, wodurch eine Mitwirkung von akuten Störfaktoren nicht ausgeschlossen werden kann.



CBZ concentration [mg/L]

Abb. 27: Schwimmaktivität 6 Tage alter Larven (in % der Zeit) im Dunklen nach Belastung mit Carbamazepin (CBZ). NC = Negativkontrolle (negative control), SC = Lösungsmittelkontrolle (solvent control; 0,5 % DMSO). Die Kästen beinhalten die Messwerte des 25. bis 75. Perzentils, die waagerechten Linien kennzeichnen den jeweiligen Median und die Balken schließen alle Werte des 10. bis 90. Perzentils ein. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA-on-ranks in Kombination mit Dunn's *Post hoc*-Test).



Abb. 28: Durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit 6 (links) und 12 (rechts) Tage alter Larven, die in mit Fluoxetin (FLX) belastetem Wasser aufgezogen wurden. NC = Negativkontrolle (negative control). Die Kästen beinhalten die Messwerte des 25. bis 75. Perzentils, die waagerechten Linien kennzeichnen den jeweiligen Median und die Balken schließen alle Werte des 10. bis 90. Perzentils ein. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA-on-ranks in Kombination mit Dunn's *Post hoc*-Test).



MPX concentration [mg/L]

Abb. 29: Insgesamt von 6 Tage alten Larven zurückgelegte Schwimmdistanz während der Dunkelphase unter Einfluss von Paraoxon-methyl (MPX, methyl paraoxon). NC = Negativkon-trolle (negative control). Die Kästen beinhalten die Messwerte des 25. bis 75. Perzentils, die waagerechten Linien kennzeichnen den jeweiligen Median und die Balken schließen alle Werte des 10. bis 90. Perzentils ein. *** p < 0.001 statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (One-way ANOVA-on-ranks in Kombination mit Dunn's *Post hoc*-Test).

Paraoxon-methyl hatte schließlich einen negativen Einfluss auf die Schwimmgeschwindigkeit (nicht gezeigt) und -distanz im Dunklen. Von 0,25 mg/L aufwärts wurden durchgängig statistisch signifikante (p < 0.01) Reduktionen der Schwimmdistanz gemessen, möglicherweise besteht der Effekt sogar schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (Abb. 29).

6. Arbeiten, die ausstehen bzw. zu keiner Lösung geführt haben

Zur Untersuchung des Riechsystems sollten ursprünglich zwei Methoden entwickelt werden, um so Effekte auf unterschiedliche Strukturen erfassen zu können: das eigentliche sowie die olfaktorischen Glomeruli. Zusätzlich zu dem erfolgreich etablierten Assay für das olfaktorische Epithelium, mit dessen Hilfe eine Schädigung der Riechsinneszellen im Riechepithel nach einer Belastung mit einer neurotoxischen Substanz nachgewiesen werden kann, sollten also auch Auswirkungen auf die Struktur der Glomeruli in den Riechkolben untersucht werden. Hierfür war die gleiche Färbung wie beim Retina-Assay vorgesehen.

Die Axone der Sinnesneuronen des Riechepithels (OSN) ziehen direkt in den olfaktorischen Bulbus und bilden hier rundliche Strukturen, die sogenannten Glomeruli. Die Axone der OSN bilden Synapsen mit bulbären Mitralzellen aus, welche sensorische Signale in olfaktorisch verarbeitende Hirnareale weiterleiten (Braubach et al. 2012, Fuller et al. 2006, Abb. 30).



Abb. 30: Anatomische und morphologische Organisation des Geruchssystems beim Zebrabärbling (*Danio rerio*; aus: Calvo-Ochoa & Byrd-Jacobs, 2019). (A) Lage des olfaktorischen Systems im Zebrabärbling. Dargestellt ist die dorsale Seite. (B) Morphologie des olfaktorischen Organs. Das in Lamellen angeordnete sensorische Riechepithel ist schwarz dargestellt. (C) Riechepithel, bestehend aus den folgenden olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSNs): Mikrovilli-tragend Neuronen (mv); kryptische Neuronen (crt); Cilien-tragende Neuronen (cil); kappe (kp); birnenförmige Neuronen (pr). OSNs verlängern ihre Axone zum Bulbus olfactorius über den Nervus olfactorius (ON) zum Riechkolben und bilden dort diskrete Glomeruli. (D) Organisation des Bulbus olfactorius in drei Schichten: Riechnervenschicht (ONL); Glomerular-schicht (GL); und innere Zellschicht (ICL).

Da die Axone der olfaktorischen sensorischen Neuronen (OSNs) direkt in den Riechkolben weiterziehen und hier zusammen mit den Mitralzellen die Glomeruli ausbilden, wäre es interessant gewesen, die Größe der Glomeruli auszumessen bzw. die Anzahl der Glomeruli auszuzählen und so beispielsweise den Schaden auf sekundärer Ebene (im Riechkolben) zu bestimmen, Eventuell könnte man sogar ermitteln, welche OSN im Riechepithel durch die Belastung mit den Projektsubstanzen geschädigt werden. Es gibt eine feste Anzahl von Glomeruli, und in jeden einzelnen davon ziehen nur die Axone eines spezifischen Sinneszelltyps.

In Abb. 31 sind die Glomeruli eines 72 h alten Embryos in zwei verschiedenen Größen dargestellt. Der Färbeprozess ist der gleiche wie beim Retina-Assay (vgl. Tab. 3), nur die Embryonen wurden anders ausgerichtet (dorsale Draufsicht), da sich das Gehirn auf der Rückseite befindet. Leider sind die Glomeruli relativ große Strukturen, und es wurde keine morphologische Struktur gefunden, welche sicherstellt, dass die Aufnahmen immer in der gleichen Ebene erfolgen (wie z.B. der Sehnerv beim Retina-Assay). Dadurch konnten die exakte Lage der mikroskopischen Aufnahmen nicht kalibriert und ausgewertet werden; die Entwicklung dieser Methode wurde daher nicht weiterverfolgt.



Abb. 31: *In vivo*-Färbung der bulbären Glomeruli in 72 h alten Embryonen des Zebrabärbling (*Danio rerio*) mit Hilfe des Farbstoffs Cumarin 6. Auswertung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem 20x Tauchobjektiv (A); 60x Tauchobjektiv (B). Die Bilder wurden aus einer dorsalen Sicht aufgenommen.

Im Antrag war im Rahmen von AP 2 ein vertiefter Vergleich der neurotoxischen Effekte in Fisch(embryonen) und Säugetieren vorgesehen. Aufgrund der Maßnahmen zur Minderung der Folgen der Corona-Pandemie verzögerten sich jedoch seit März 2020 alle Laborarbeiten in einem Maße, dass die Auswertung der Daten noch nicht abgeschlossen werden konnte. Es ist jedoch geplant, einen solchen Vergleich spätestens in der Dissertation der Projektmitarbeiterin Carola Leitner abzuschließen.

Aus dem gleichen Grund konnte ein weiteres Ziel von AP 2, die Entwicklung eines Prädikationsmodells Fischembryo \rightarrow Säugetier für die Reaktion auf neurotoxische Substanzen in der Projektlaufzeit nicht erreciht werden.

In AP 3 sollte ursprünglich eine automatisierte Videoanalyse verwendet werden, was jedoch leider mit der kommerziell verfügbaren Software scheiterte. Mehrere Programme (z. B. "Noldus EthoVision", "Tracker" und "ImageJ") wurden getestet, konnten jedoch die kleinen und zahlreichen Jungfische aufgrund der unzureichenden Auflösung nicht zuverlässig beim freien Schwimmen verfolgen. ImageJ oder eine ähnlich frei konfigurierbare Software könnte möglicherweise langfristig so kalibriert werden, dass zumindest das automatische Erkennen von Fischen in Standbildern möglich ist; aufgrund des hohen Zeitbedarfs für die anfängliche Einrichtung und zweifelhaften Erfolgsaussichten im Rahmen dieses Projekts wurde diese Option jedoch zugunsten zusätzlicher Laborversuche nicht weiterverfolgt.

Obwohl im Detail im Antrag nicht formuliert, war im Anschluss an die anderen Verhaltensversuche geplant, die Fütterung und das Fressverhalten der Fische über einige Minuten zu filmen, um so eventuelle Effekte der Substanzexposition auf das Fressverhalten zu erfassen. Die für juvenile und adulte Zebrabärblinge üblichen Futtermittel erwiesen sich jedoch für diesen Zweck als ungeeignet, da sie auf den Videomitschnitten nicht zuverlässig erkannt werden konnten und die Gabe größerer Futterflocken bei den meisten Fischen inklusive der Kontrollgruppen (noch) nicht zu der erhofften Reaktion führte. Veränderungen im Fressverhalten infolge einer Belastung der Fische mit neurotoxischen Substanzen konnte daher nicht untersucht werden.

7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wasser spielt eine zentrale Rolle im menschlichen Alltag, wobei der Verteilung und Sicherung der Trinkwasserqualität eine herausfordernde Rolle für Wirtschaft und Wissenschaft zukommt. Anthropogene Einflüsse stellen durch Eintrag einer Vielzahl von Chemikalien und Arzneimitteln ein größer werdendes Risiko für die Wasserqualität dar. Durch Regulierungsmaßnahmen wie der europäischen Chemikalienrichtlinie REACH (EU 2006) und die EU-Wasserrahmenrichtlinie (EU 2000, 2008) werden fortlaufend eine rasch wachsende Zahl von anthropogenen Schadstoffen in Wasserkörper nachgewiesen. Aufgrund der zunehmenden Anzahl von trinkwasserrelevanten, unter anderem neurotoxischen Substanzen wurden Forschungsprojekte zur risikobasierten Bewertung sowie zur Entwicklung von akuten und vor allem mechanismuspezifischen Biotests aufgelegt, um das vermeintliche Schädigungspotenzial auch sicher zu identifizieren.

Angesichts so schwerwiegender neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer sowie verschiedener Tumoren im Nervensystem, für deren Auftreten auch die Wirkungen chemischer Stoffe im Trinkwasser nicht ausgeschlossen werden können, müssen Untersuchungen zur Neurotoxizität ein fester Bestandteil der toxikologischen Prüfung sein. Neurotoxische Effekte bei Fischen wurden allerdings routinemäßig bisher kaum erhoben. So werden zum einen zwar vereinzelt bestimmte Genaktivierungen als Biomarker untersucht, deren ökologische und ökotoxikologische Bedeutung muss jedoch erst noch belegt werden. Vor allem aber werden sehr zeit- und kostenintensive Verhaltensstudien entwickelt, die jedoch in einer routinemäßigen Durchführung von Tests zur Stoffbewertung so schnell keinen Platz finden werden. Der Bedarf an routinemäßig einsetzbaren, raschen und kostengünstigen Verfahren zum Nachweis primär neurotoxischer Effekte ist also offenbar.

Aus der Sicht des Tierschutzes ist der Einsatz von Fischen in der ökotoxikologischen Routine natürlich grundsätzlich problematisch; andererseits stellen Fische nun mal die Repräsentanten für Wirbeltiere in aquatischen Ökosystemen dar. Zwar wurden im Rahmen des BMBF-Projekts NeuroBox in Teilprojekt 2 Methoden entwickelt, die nach Möglichkeit nur nach derzeitiger Rechtslage nicht im Sinne des Tierschutzes geschützt sind (EU 2010, Strähle et al. 2012), jedoch werden sich bestimmte neurotoxische Effekte noch eine ganze Weile definitiv nur in intakten Organsimen sicher nachweisen lassen. Der Fischembryo stellt daher einen auch von offizieller Seite in der EU Tierschutz-Direktive 2010/63/EU (EU 2010) abgesegneten Kompromiss dar, da ein nur wenig entwickeltes System eingesetzt wird, das aber bereits die vollständige Integration eines intakten Organismus aufweist. Der in NeuroBox entwickelte *Novel tank*-Test funktioniert dagegen naturgemäß nur mit Fischen ab einem bestimmten Alter.

Wie bereits im Abschlussbericht zum Vorgängerprojekt ToxBox ausgeführt, eröffnen neue Erkenntnisse in der Zell- und Entwicklungsbiologie und die systematische Weiterentwicklung standardisierter Techniken zur Kultivierung humaner organspezifischer Zellen und bildgebender Verfahren mit Embryonen des Zebrabärblings Möglichkeiten für eine kombinierte Strategie, die *In vitro*- und *In vivo*-Verfahren vereint und mit realisierbarem Aufwand Daten zur neurotoxischen Wirkung von chemischen Substanzen in biologischen Systemen inklusive Wirbeltieren erbringen kann. In diesem Zusammenhang sollen die auch in diesem Bericht vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag zur Datengenerierung leisten, um sichere Grenzwerte für Substanzen mit unsichere Datenlage festzusetzen.

Im Leitfaden für ein gefährdungsbasiertes Risikomanagement von anthropogenen Spurenstoffen, der im Rahmen von ToxBox veröffentlicht wurde (Eckhardt et al. 2017, Grummt et al. 2018), wurden für den Nachweis neurotoxischer Effekte vor allem das Verfahren für den Nachweis der Schädigung des Seitenliniensystems ("Neuromasten-Assay") sowie der Acetylcholinesterase-Assay als *In vivo*-Verfahren eingebracht, da

- (1) beide Verfahren mit geringem technischem, zeitlichem, personellem und finanziellem Aufwand durchzuführen sind;
- (2) beide Verfahren nicht geschützte Entwicklungsstadien von Wirbeltieren einsetzen, also aus juristischer Sicht keine Tierversuche darstellen und nicht als solche zu beantragen sind;
- (3) beide Assays sich als hoch empfindliche Nachweisverfahren erwiesen haben;
- (4) sich beide Verfahren als relativ robust gegen verfahrensbedingte Störungen sowie Störungen durch andere Substanzen erwiesen haben (geringe Gefahr falsch positiver Befunde).

Die histologische Struktur von Retina und Riechepithel hatte sich im Projekt ToxBox dagegen als relativ resistent gegen den Einfluss neurotoxischer Substanzen erwiesen. Im hier beschriebenen Folgeprojekt konnte Frau Leitner jedoch ein neues Verfahren entwickeln, das technisch sehr einfach, schnell und reproduzierbar neurotoxische Effekte im Auge der Embryonen des Zebrabärblings erfassen kann. Analoges gilt für das Riechepithel. Alle drei Verfahren zur Erfassung neurotoxischer Effekte in Zebrabärblingsembryonen verzichten dabei auf den Einsatz teurer, unter Umständen schwer zu beschaffender Antikörper und sollten daher von den meisten Labors durchzuführen sein, sofern diese über ein Fluoreszenzmikroskop verfügen. Obwohl alle drei Verfahren ren im Heidelberger Labor unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt wurden, sollte ein normales Fluoreszenzmikroskop ausreichen.

Die im Rahmen des BMBF-Projekts NeuroBox durchgeführten Arbeiten zur Etablierung von Verfahren zum Nachweis neurotoxischer Effekte bei Wirbeltieren (Fischen) konnten also weitgehend erfolgreich abgeschlossen werden. Die Etablierung, Optimierung und Validierung der Verfahren konnten im Rahmen des Teilprojekts weitgehend im Sinne der ursprünglich geplanten Aufgabenstellung durchgeführt werden (Ausnahmen siehe Kapitel 6 dieses Berichts).

8. Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Verlaufs des Projekts sind keine Aktivitäten oder zentralen Publikationen bekannt geworden, die mit dem Erfolg des Projekts nicht in Einklang zu bringen wären.

9. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Methoden zur Ermittlung von neurotoxischen Effekten auf Seitenliniensystem, Auge und Riechsystem sowie die Acetylcholinesteraseaktivität sind als sehr empfindliche und unterschiedlich spezifische Methoden zur Einordnung von Substanzen mit unsicherer Datenlage in das GOW-Konzept anzusehen. Dem Verwertungsplan folgend, können diese Methoden Eingang finden in eine eventuelle Erweiterung des Leitfaden für ein gefährdungsbasiertes Risikomanagement von anthropogenen Spurenstoffen (Grummt et al. 2018).

Die **spezifische wissenschaftliche Verwertung** der Erkenntnisse aus dem Teilprojekt besteht vor allem

- (1) in der Bereitstellung und Optimierung eines Methodeninstrumentariums zum Nachweis neurotoxischer Effekte bei Fischen.
- (2) Daneben sollen wissenschaftlich fundierte Grundlagen für die Bewertung der ökotoxikologischen Relevanz (Populationsrelevanz) von neurotoxischen Effekten bei Fischen bereitgestellt werden.

Die Verbindung der humantoxikologischen Bewertung mit den ökotoxikologischen Ansätzen gewährleistet eine umfassende Beurteilung im gesamten Wasserkreislauf und stellt damit ein integriertes Frühwarnsystem für die Trinkwasserversorgung dar. Wissenschaftlich gesehen sind in diesem Verbundprojekt vor allem die neu gewonnenen Erkenntnisse um neurotoxische Wirkungsmechanismen von großem Interesse. Der direkte Vergleich zwischen Säugetier und Fischmodell liefert neue wissenschaftlich relevante Erkenntnisse, die wichtig für die korrekte Interpretation und Qualitätsabschätzung (z. B. Limitierung der Modelle) der entsprechenden Systeme sein können.

Es ist geplant, die Erkenntnisse in hochrangigen peer-reviewten Zeitschriften zu publizieren. Die Vorstellung der Befunde wissenschaftlichen Workshops und Konferenzen wurde durch die Corona-Pandemie bisher leider verhindert.

Die *technische Verwertung* des Teilprojekts besteht vor allem in der Erarbeitung von standardisierten Methoden für den Nachweis neurotoxischer Effekte bei Fischen. Sollten, wie vermutet, adverse Wirkungen von neurotoxischen Wirkungen nachweisbar

sein, fließen diese in die toxikologische und ökotoxikologische Bewertung der Effekte ein. Hierin besteht letztendlich auch die wirtschaftliche Bedeutung der Untersuchungen: Die langfristige Vermeidung von Schäden durch neurotoxische Stoffe ist für ein nachhaltiges Management aquatischer Ökosysteme und Ressourcen von größter ökologischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

Hierin besteht letztendlich auch die *wirtschaftliche Bedeutung* der Untersuchungen. Die langfristige Vermeidung von Schäden durch neurotoxische Stoffe sind für ein nachhaltiges Management aquatischer Ökosysteme und Ressourcen von größter ökologischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

10. Bezug zu förderpolitischen Zielen des BMBF

Die Erfassung und Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen als Grundlage für die Minimierung von Schadstoffen im Wasserkreislauf war das Hauptziel des aktuellen Projekts. Das Projekt entsprach in seiner Fragestellung als Anschlussprojekt von ToxBox in der RiSKWa-Fördermaßnahme den förderpolitischen Zielen des BMBF. In dem hier beschriebenen Teilprojekt wurden weitere Methoden zur Detektion von wirkungsspezifischen neurotoxischen Effekten entwickelt, um dem Projektergebnis im Verbund Tox-Box zu neurotoxischen Wirkmechanismen eine breitere und repräsentativere Basis zu geben. Die gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse sind sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus regulatorischer Sicht von Bedeutung.

11. Zitierte Literatur

- Ahmed, T.S., Gerlai, R., Fernandes, Y. (2012) Effects of animated images of sympatric predators and abstract shapes on fear responses in zebrafish. Behaviour 149: 1125-1153.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.B. and Grandjean, P. (2000) Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. Toxicology 144: 121-127.
- Bass, S.L.S., Gerlai, R. (2008. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. Behav. Brain Res. 186: 107-117.
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L. and Augustine-Rauch, K.A. (2010) Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 89: 66-77.
- Braubach, O.R., Fine, A., Croll, R.P. (2012) Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*). J Comp Neurol 520: 2317-2339.
- Brown, D. (2018) Tracker video analysis and modeling tool for physics education. http://physlets.org/tracker/.
- Butler, J.M., Field, K.E: and Maruska, K.P. (2016) Cobalt chloride treatment used to ablate the lateral line system also impairs the olfactory system in three freshwater fishes. PLos One 11(7):e0159521.

- Byrd, C.A. and Brunjes, P.C. 1995) Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: Histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. J Comp Neurol, 358: 247-259.
- Calvo-Ochoa, E. and Byrd-Jacobs, C.A. (2019) The olfactory system of zebrafish as a model for the study of neurotoxicity and injury: implications for neuroplasticity and disease. Int J Mol Sci. 20(7):1639
- Chow, E.S., Hui, M.N., Cheng, C.W., Cheng, S.H. (2009) Cadmium affects retinogenesis during zebrafish embryonic development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 15: 68-76.
- Claudio, L., Kwa, W.C., Russell, A.L. and Wallinga, D. (2000) Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. Toxicol. Appl. Pharmacol. 164: 1-14.
- Ducharme, N.A., Reif, D.M., Gustafsson, J.A. and Bondesson, M. (2015) Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. Reprod. Toxicol. 55: 3-10.
- DeMicco, A., Cooper, K.R., Richardson, J.R. and White, L.A. (2010) Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. Toxicol. Sci. 113: 177-186.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R.M. 1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.
- EU (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy (EU Water Framework Directive). Off. J. EU L327: 1-72.
- EU (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Off. J. EU L396: 1-849.
- EU (2008) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal L 348, 84-97.
- EU (2010) 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 L 276: 33-79.
- Flentke, G.R., Klingler, R.H., Tanguay, R.L., Carvan, M.J.r. and Smith, S.M. (2014) An evolutionarily conserved mechanism of calcium-dependent neurotoxicity in a zebrafish model of fetal alcohol spectrum disorders. Alcohol. Clin. Exp. Res. 38: 1255-1265.
- Gerlai, R., Fernandes, Y., Pereira, T. (2009. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. Behav. Brain Res. 201: 318-324.
- Eckhardt, A., Grummt, T., Kramer, M., Braunbeck, T. and Hollert, H. (2017) ToxBox a new approach for evaluating anthropogenic trace substances in drinking water. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 390 (Suppl. 1): S1-S101.

- Fuller, C.L., Yettaw, H.K., Byrd, C.A. (2006) Mitral cells in the olfactory bulb of adult zebrafish (*Danio rerio*): Morphology and distribution. J Comp Neurol, 499: 218-230.
- Gramage, E., Li, J., Hitchcock, P. (2014) The expression and function of midkine in the vertebrate retina. Brit. J. Pharmacol. 171: 913-923.
- Grandjean, P. and Landrigan, P.J. (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. Lancet 368: 2167-2178.
- Grummt, T., Braunbeck, T., Hollert, H., Kramer, M. (2018) Leitfaden Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box). Umweltbundesamt Bad Elster.
- Guo, P., Huang, Z., Tao, T., Chen, X., Zhang, W., Zhang, Y. and Lin, C.C. (2015) Zebrafish as a mod-el for studying the developmental neurotoxicity of propofol. J. Appl. Toxicol. 35: 1511-1519.
- Kais, B., Stengel, D., Batel, A., Braunbeck, T. (2015) Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 16329-16339.
- Kokel, D. and Peterson, R.T. (2011) Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. Methods Cell Biol. 105: 517-524.
- Küster, E. (2005) Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. Aquat. Toxicol. 75: 76-85.
- Lee, J., Freeman, J.L. (2014) Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. Neurotoxicology 43: 57-64.
- Lee, S.H., Kang, J.W., Lin, T., Lee, J.E. and Jin, D.I. (2013) Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. Biomed. Res. Int. 726478.
- Luca, R.M., Gerlai, R. (2012) In search of optimal fear inducing stimuli: Differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish. Behav. Brain Res. 226: 66-76.
- Luo, M., Gates K. S., Henzl, M. T., Tanner, J. J. (2015) Diethylaminobenzaldehyde is a covalent, irreversible inactivator of ALDH7A1. ACC Chem. Biol., 10: 693-697.
- Maximino, C., Benzecry, R., Matos Oliveira, K.R., de Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A.M., Broock Rosemberg, D., de Oliveira, D.L., Blaser, R. (2012) A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. Behaviour 149: 1099-1123.
- Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B. and Schabtach, E. 1985) Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. J. Comp. Neurol. 233: 377-389.
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y. and Tanaka, T. (2015) Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. Congenit. Anom. (Kyoto) 55: 1-16.
- OECD (2009) OECD guideline for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test No. 229: Fish short-term reproduction assay. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.

- OECD (2013) OECD guideline for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. OECD Test Guideline 210: Fish Early-Life Stage Test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Parng, C., Roy, N.M., Ton, C., Lin, Y. and McGrath, P. (2007) Neurotoxicity assessment using zebrafish. J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 55: 103-112.
- Peal, D.S., Peterson, R.T. and Milan, D. (2010) Small molecule screening in zebrafish. J. Cardiovasc.Transl. Res. 3: 454-460.
- Raible, D.W., Kruse, G.J. (2000) Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. J. Comp. Neurol. 421: 189-198.
- Scheil, V., Kienle, C., Osterauer, R., Gerhardt, A., Kohler, H.R. 2009) Effects of 3,4dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Ecotoxicology 18: 355-363.
- Selderslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., De Coen, W. and Witters, H.E. (2009) Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. Reprod. Toxicol. 28: 308-332.
- Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., De Coen, W. and Witters, H.E. (2010) Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol. 32: 460-471.
- Selderslaghs, I., Hooyberghs, J., Blust, R. and Witters, H.E. (2013) Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. Neurotoxicol. Teratol. 37: 44-56.
- Stengel, D., Zindler, F. and Braunbeck, T. (2017) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Comp. Biochem. Physiol. 193C: 18-29.
- Stengel, D., Wahby, S., Braunbeck, T. (2018) In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environ. Sci. Pollut. Res. 25: 4066-4084.
- Stewart, A.M., Cachat, J., Gaikwad, S., Robinson, K.S.L., Gebhardt, M. & Kalueff, A.V. (2013) Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. Neurochem. Int. 62: 893-902.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. and Braunbeck, T. (2012) 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. 33: 128-32.
- Stratton, K.R., Howe, C. & Battaglia, F.C. (1996; eds.) Fetal alcohol syndrome: Diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment. Washington, DC: National Academy Press.
- Taylor, K.L., Grant, N.J., Temperley, N.D. and Patton, E.E. (2010) Small molecule screening in zebrafish: an *in vivo* approach to identifying new chemical tools and drug leads. Cell Commun. Signal. 8: 11.
- Tierney, K.B. (2011) Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. Biochim. Biophys. Acta 1812: 381-389.

- Ton, C., Lin, Y. and Willett, C. (2006) Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. Birth Defects Res.76: 553-567.
- Velki, M., Meyer-Alert, H., Seiler, T.B., Hollert, H. (2017) Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. Aquat. Toxicol. 193: 187-200.
- Watanabe, K., Nishimura, Y., Oka, T., Nomoto, T., Kon, T., Shintou, T., Hirano, M., Shimada, Y., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Wang, Z., Zhang, Z., Nishimura, N., Miyazaki, T., Imamura, T., Tanaka, T. (2010) *In vivo* imaging of zebrafish retinal cells using fluorescent coumarin derivatives. BMC Neurosci. 11: 116.
- Yen, J., Donerly, S., Levin, E.D., Linney, E.A. (2011) Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. Neurotoxicol. Teratol. 33: 735-741.
- Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T. (2019) Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. Ecotoxicol. Environ. Saf. 186: 109754

12. Bisherige eigene Publikationen im Berichtszeitraum, die auf RiSKWa-Projekte zurückgehen, sowie geplante Publikationen

- Eckhardt, A., Grummt, T., Kramer, M., Braunbeck, T. Hollert, H. (2017. ToxBox a new approach for evaluating anthropogenic trace substances in drinking water. Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol. 390 (Suppl 1): S89
- Stengel, D., Zindler, F., Braunbeck, T. (2017. An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Comp. Biochem. Physiol. 193C, 18-29.
- Stengel, D., Wahby, S., Braunbeck, T. (2018. In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 4066-4084.
- Grummt, T., Triebskorn, R., Oehlmann, J., Braunbeck, T., Happel, O. (2017. RiSKWa-Statuspapier: Methoden zur (öko-)toxikologischen Bewertung von Spurenstoffen im Wasserkreislauf - Ergebnisse des Querschnittsthemas "(Öko-)Toxikologie". Dechema, Frankfurt am Main.
- Grummt, T., Braunbeck, T., Hollert, H., Kramer, M. (2018. Leitfaden Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box). Umweltbundesamt Bad Elster.

Es ist davon auszugehen, dass im Zuge der beiden in Heidelberg entstehenden Dissertationen (Carola Leitner, Lukas Frese) wenigstens 4 Publikationen in Peer-begutachteten Zeitschriften aus dem Projekt NeuroBox resultieren werden.

Anhang 13.

Anhang 1: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (Danio rerio) nach Belastung mit ausgesuchten potentiell neurotoxischen Substanzen 13.1

Acetominophen



< 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn´s Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Seite 55 von 69



Aldicarb

Seite 56 von 69



Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 57 von 69



Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 58 von 69



Diazinon-oxon

0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn's Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.



Abb. A6: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) nach 72 bzw. 96 h Belastung mit Ethanol. Als Lösungsmittel- bzw. Negativkontrolle wurden 0,1 % DMSO bzw. Kunstwasser benutzt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn's Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

Seite 60 von 69

Ethanol



Abb. A7: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (*Danio rerio*) nach 72 bzw. 96 h Belastung mit Methanol. Als Lösungsmittel- bzw. Negativkontrolle wurden 0,1 % DMSO bzw. Kunstwasser benutzt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn´s Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Nonylphenol



Abb. A8: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (Danio rerio) nach 72 bzw. 96 h Belastung mit Nonylphenol. Als Lösungsmittel- bzw. Negativkontrolle wurden 0,1 % DMSO bzw. Kunstwasser benutzt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn´s Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Seite 62 von 69 Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)



Propylthiouracil

Abb. A9: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (Danio rerio) nach 72 bzw. 96 h Belastung mit Propylthiouracil. Als Lösungsmittel- bzw. Negativkontrolle wurden 0,1 % DMŠO bzw. Kunstwasser benutzt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn's Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.



Seite 64 von 69





Abb. A12: Veränderungen in der Fläche der inneren plexiformen Schicht im Auge von Embryonen des Zebrabärblings (Danio rerio) nach 72 bzw. 96 h Belastung mit Kobaltchlorid. Als Lösungsmittel- bzw. Negativkontrolle wurden 0,1 % DMSÓ bzw. Kunstwasser benútzt. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn's Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Seite 66 von 69 Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)



p < 0,01 (One-way ANOVA gefolgt von Dunn's Test). Es wurden 3 unabhängige Replikate mit N = 10 durchgeführt.

Cadmiumchlorid

Seite 67 von 69 Abschlussbericht RiSKWa-NeuroBox, TP 2 (Universität Heidelberg)

13.2 Anhang 2: Protokoll zur Durchführung der Verhaltensexperimente nach Langzeitbelastung (AP 3)

- 1. **Aufzucht** (Befruchtung bis 20 dpf)
 - bis 5 dpf (*days post fertilization*, Tage nach Befruchtung): Acrylglas-Becken (1.7 L, Techniplast, Italien) mit täglichem Wasserwechsel & Entfernung koagulierter Eier
 - dann größere Becken mit konstantem Durchfluss und mehrmals täglicher Fütterung (*Paramecium, Artemia*) für alle Larven einer Laichgruppe
- 2. **Belastung** (ab 21 dpf)
 - je 10 Fische pro Becken ("Versuchsgruppen")
 - konstante Verdünnung: Stammlösung über Peristaltikpumpen, 20-fache Wassermenge über Rotameter[®] zulaufen lassen (mind. 2 Beckenvolumen pro Tag)
 - tägliche Prüfung und ggf. Rekalibrierung der Flussraten

3. Verhaltensuntersuchungen (34 dpf)

- Lärmquellen im Raum unterbinden Unterhaltungen, Pumpenmotoren etc.
- Beobachtungsbecken mit Wasser aus der Aquarienanlage füllen (entspricht "Verdünnungswasser" im Durchfluss - chemisch unbelastet, aber nicht steril) und auf 26 ± 1 °C temperieren
- Videoaufnahmen des Beobachtungsbeckens (Front & Draufsicht) starten
 - Fokussierung möglichst in der Mitte der Wassersäule
 - Tiefenschärfe durch geringe Blendenöffnung erhöhen
 - Schwarz-Weiß-Aufnahmen und reduzierte Framerate (10 fps) zur Optimierung der Datenmenge → höhere Auflösung möglich

3.1 *Novel tank*-Test (Umsetzung in neues Aquarium)

- rasche Überführung einer zufällig gewählten Versuchsgruppe Fische vom Belastungs- in das Beobachtungsbecken (feiner Kescher, dabei möglichst wenig Detritus aufnehmen)
- Aufnahme von 6 min Videomaterial
- spätere Auswertung basierend auf dem Aufenthalt der Fische in der oberen bzw. unteren Hälfte (sekündliche Analyse)

- "Upper half preference" (UHP): Anteil der Fische, der sich oben aufhält (Betrachtung in Relation zur Zeit)
- "*Above-control UHP*": Anzahl der UHP-Messungen (pro Minute), die oberhalb des durchschnittlichen Wertes der Negativkontrolle im gleichen Zeitraum liegen

3.2 **Predator response-Test (Feindvermeidungstest)**

- o 12-V-Motor einschalten (niedrigere Spannung, max. 5 V → niedrige Drehzahl)
 - Kontrolle via Arduino-Mikrocontroller: halbzufällige Schaltung mit wechselnder Geschwindigkeit und Dauer
- Feindattrappe vorsichtig an transparenten F\u00e4den am Beckenrand in das Wasser hinablassen
- o einen der F\u00e4den \u00fcber die ungleichm\u00e4\u00dfig geformte Motorwelle legen
 → bei jeder Drehung wird an der Attrappe "gezupft", sodass sie sich bewegt
- Aufnahme von 6 min Videomaterial
- spätere Auswertung basierend auf dem Aufenthalt der Fische in vier vertikalen Zonen (sekündliche Analyse)
 - "Predator distance": Mittelwert der Abstandsbewertungen von 1 (direkt bei der Attrappe) bis 4 (entfernteste Zone)
 - "Shoal coherence": Ausdehnung des Schwarms (Anzahl eingenommener Zonen) im Verhältnis zur Zahl der Fische – eine niedrige Zahl bedeutet einen stärkeren Schwarmzusammenhalt

3.3 **Prüfung weiterer Konzentrationen**

- o Entfernen der Versuchsfische aus dem Beobachtungsbecken
- Absaugen sämtlichen Wassers, da es durch freigesetzten "Schreckstoff" eines gefangenen Fisches verunreinigt sein könnte, was Folgeversuche unvergleichbar machen würde
- Wiederholung aller Schritte ab Punkt 3











Abschlussbericht zu Teilprojekt 3 des Verbundvorhabens "METHODISCHE WEITERENTWICKLUNG ZUR BEWERTUNG VON NEUROTOXISCHEN EFFEKTEN IM WASSERKREISLAUF" NeuroBox

Förderkennzeichen: 02WRS1419C



Frankfurt & Aachen, den 23.06.2021

RWTH Aachen, Institut für Umweltforschung (Biologie V), Institut für Biologie II Worringerweg 1, 52074 Aachen & Dept. Evolutionary Ecology and Environ Toxicology, Goethe-Universität Frankfurt

> Prof. Dr. Henner Hollert (Teilprojektleitung)* Dr. Jessica Legradi (Co-Teilprojektleitung) Prof. Dr. Martina Roß-Nickoll (Professurvertretung) Prof Dr. Marc Spehr Prof. Dr. Björn Kampa Dr. Andreas Schiwy MSc. Ann-Cathrin Haigis MSc. Sebastian Malinowski MSc. Sebastian Malinowski MSc. Jonas Nelles

> > *Email: hollert@bio.uni-frankfurt.de

Zwischenbericht zu Teilprojekt 3

Zuwendungsempfänger: RWTH Aachen University	Förderkennzeichen: 02WRS1419C
Vorhabenbezeichnung: NeuroBox - "Methodische Weiterentwicklung zur Erweiterung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf" - Identifikation von neurotoxischen Wirkungsmechanismen (<i>in vivo</i>) zur Entwicklung neuer wirkungsspezifischer Testverfahren. Teilprojekt 3	
Laufzeit des Vorhabens: 01.03.2017 bis 31.12.2020	
Berichtszeitraum: vom 01.03.2017 bis 31.12.2020	

Der Abschlussbericht enthält kurz gefasste Angaben zu folgenden Punkten/Fragen:

- 1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse.
- 2. Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des Auftraggebers geänderten) Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung.
- 3. Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Angebot geändert (Begründung)?
- 4. Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Auftrags relevant sind (Darstellung der aktuellen Informationsrecherchen nach Nr. 2.1 BNBEST-BMBF 98).
- 5. Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?
- 6. Fortschreibung des Verwertungsplans. Diese soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des Zuwendungsempfängers brauchen nicht offenbart zu werden):
- a. Erfindungen/ Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten,

- b. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) z.B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Auftrags dies zulässt),
- c. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u.a. einzubeziehen,
- d. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse.

Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Innerhalb des Verbundvorhabens sollte eine Weiterentwicklung von Methoden durchgeführt werden mit dem Ziel der Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf. Innerhalb des Teilprojekts 3 wurde die Identifikation von neurotoxischen Wirkungsmechanismen (*in vivo*) zur Entwicklung neuer wirkungsspezifischer Testverfahren durchgeführt. Hierbei soll das biologische Modell, der Embryo des Zebrabärblings (*Danio rerio*), im Teilprojekt für die Entwicklung neuer Strategien und Methoden zur Identifizierung von Neurotoxizität im GOW Konzept untersucht und weiterentwickelt werden. Vor allem die Identifikation von *Light-off/Light-on* neurologischen Wirkungsmechanismen und der Vergleich von unterschiedlichen Behaviour-Assays mit qPCR- und multiplen -omic-Ansätzen spielen in diesem Teilprojekt eine zentrale Rolle. Dabei sollen einige der im Zebrabärbling identifizierten Kandidatensubstanzen in spezifischen und im Rahmen des beantragten Teilprojekts eigens entwickelten neuropathologischen Testverfahren im Mausmodell untersucht werden. Das Teilprojekt behandelt die folgenden vier Kernaspekte, von der Identifikation spezifischer Wirkungsmechanismen, über die Entwicklung neuer effektiver Testverfahren, bis hin zur Validierung möglicher humanrelevanter Mechanismen im Nagermodell und zur Anwendung dieser Tests im Screening-Ansatz.

2. Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Voraussetzungen für das Teilvorhaben entsprachen denen des gesamten Verbundes. Sie wurden auch von der Covid-Pandemie signifikant beeinflusst. Wir verweisen daher auf die Darstellung der Voraussetzungen im Bericht der Koordination.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Folgenden werden der Zeitplan des Teilprojektes (ohne kostenneutrale Verlängerung bis 12/2020) und die integrierten Meilensteine vorgestellt.

Meilensteine an der RWTH Aachen / Goethe-Universität

RWTH-M1: Basierend auf einer intensiven Literatursuche soll eine Liste erstellt werden von bisher verwendeten Verhaltenstests in Zebrabärblingen bis zu einem Alter von 5 Tagen. Dabei soll ein Überblick gewonnen werden, vor allem für Tests mit unterschiedlichen Stimulantien wie Licht, Ton oder Vibrationen aber auch verschiedenen Testparametern, wie Geschwindigkeit, Bewegungswinkel und Abstand zu Objekten. Zusätzlich soll eine Liste mit neurotoxischen Substanzen, mit verschieden toxischen Mechanismen erstellt werden. Die gewonnen Ergebnisse sind die Grundlage für die experimentelle Phase des Projektes.

RWTH-M2: Mittels einer intensiven Versuchsphase sollen eine Reihe von verhaltensbasierten Testverfahren für Zebrabärblinge bis zu einem Alter von 5 Tagen auf ihre wirkungsspezifische Anwendung getestet werden. Am Ende werden die spezifischen Tests zu einem Screeningverfahren kombiniert.

RWTH-M3: Durch eine Literatursuche sollen potenzielle humane Biomarker für neurotoxische Effekte ermittelt werden. Dabei werden vor allem Daten von Studien neurologischer Krankheiten,

Autismus, ADHD, Parkinson evaluiert. Mögliche Zusammenhänge zu Veränderungen nach einer Exposition mit Schadstoffen sollen zusätzlich analysiert werden z.B. in öffentlich zugänglichen Microarray-Studien.

RWTH-M4: Nach der Analyse der experimentellen Ergebnisse der -omics-Studien sollen eine Reihe von neuen Biomarkern zur Detektion von Neurotoxizität ermittelt werden. Dafür sollen Gene oder Proteine ermittelt werden, welche spezifische Veränderung nach einer Exposition an neurotoxischen Substanzen zeigen.

RWTH-M5: Zunächst sollen Mäuse neurotoxischen Stoffen ausgesetzt werden und ihr olfaktorisches bzw. visuelles System auf zellmorphologische und neuroanatomische Veränderungen untersucht werden. Dabei sollen neben klassischen histologischen Methoden vor allem moderne Tissue Clearing-Verfahren und Lichtblatt-Mikroskopie eingesetzt werden. 3D Rekonstruktionsanalysen sollen Aufschluss über neuropathische Veränderungen geben.

RWTH-M6: Physiologische Analysen von rekombinant exprimierter Ionenkanälen, als mögliche Zielproteine (Targets) neurotoxikologisch wirksamer Substanzen, sollen molekulare Wirkungsmechanismen identifizieren und gleichzeitig Möglichkeiten für die Entwicklung von Schnelltestverfahren aufzeigen.

RWTH-M7a: Basierend auf den strukturanalytischen Befunden (RWTH-M5) sollen potenzielle funktionale Defizite nach Schadstoffexposition mit Hilfe physiologischer Messmethoden (Elektrophysiologie, Ca2+ Imaging) *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

RWTH-M7b: Veränderungen am visuellen oder olfaktorischen System in Mäusen sollen anschließend mit Effekten im Fischmodell verglichen werden. Dafür sollen Fischembryonen den gleichen Stoffen ausgesetzt werden und Effekte an den vorher identifizierten molekularen Systemen untersucht werden.

RWTH-M7c: Die durch *in vivo* Tests gewonnen Erkenntnisse sollen mit den Ergebnissen standardisierter *in vitro* Testverfahren verglichen werden.

RWTH-M8: Nach der Exposition mit hormonstörenden Substanzen sollen detaillierte toxikologische Effektprofile erstellt werden. Dafür werden während der gesamten Exposition die phänotypischen und teilweise auch molekularen (z.B. genetische oder hormonelle) Veränderungen beobachtet. Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen Testsubstanzen sollen ermittelt werden. Effektkonzentrationen für die weiteren Tests sollen ebenfalls ermittelt werden.

RWTH-M9: Die in AP1 etablierten Tests sollen hier angewendet werden auf die hormonstörenden Substanzen, um ein neurotoxisches Profil zu erstellen. Zusätzlich sollen wenn möglich die entwickelten Biomarker (AP2) untersucht werden. Mögliche Verbindungen zu neurologischen Krankheiten und Risiken sollen ermittelt werden.

Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat das Thema der chemisch induzierten Neurotoxizität zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Die auf Englisch bezeichneten "developmental neurotoxicity" (DNT)-Forschung befasst sich mit der Identifizierung von Substanzen, die die normale Entwicklung des Nervensystems beeinträchtigen können und mit dem Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen. In diesem Kontext wurde festgestellt, dass die Entwicklung des Nervensystems anfällig für chemische Belastungen ist. Daher besteht ein zunehmender Bedarf an schnellen, zuverlässigen und tierfreien Methoden zur Identifizierung von Substanzen, die DNT verursachen können (Price et al., 2018). Vor diesem Hintergrund wurde die Verwendung des Zebrabärblingsembryo in einem Integrierten Ansatze zum Testen und Bewerten (IATA)-Ansatz als Nicht-Säugetier-Testorganismus vorgeschlagen, der für DNT-Abschätzungen geeignet ist. Ein besonderer Vorteil von frühen Lebensstadien von Zebrabärblingen im Zusammenhang mit DNT ist, dass ihr Verhalten leicht zu beobachten ist und die Organismen gut für Hochdurchsatz-Screening geeignet sind. Mit der Durchführung dieser Arbeit hofften wir, drei Ziele zu erreichen. 1) Einen Ansatz für Verhaltenstests zu entwickeln, der den Durchsatz der Experimente erhöht und eine schnelle Erkennung potentiell neurotoxischer oder -aktiver Substanzen während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung des Zebrafisches ermöglicht. Darüber hinaus aber auch gleichzeitig 2) die Anzahl der Testorganismen zu reduzieren, gemäß dem 3-R-Prinzip von "Replacement", "Refinement" und "Reduction" (Russel & Burch, 1959). Wir versuchten, beide Ziele zu erreichen, indem wir mehrere Verhaltenstests kombinierten und dieselben Organismen in diesen Tests verwendeten, um so viele Informationen aus einem einzigen Organismus wie möglich zu erhalten. Weiter 3) wollten wir untersuchen, ob es möglich ist, eine gemeinsame Verhaltensreaktion von Embryonen gegenüber bestimmten Klassen von neurotoxischen Insektiziden wie AChE-Inhibitoren, Natriumkanal-Inhibitoren oder nAChR-Inhibitoren zu identifizieren.



Zeitplan Teilprojekte an der RWTH Aachen

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Identifikation von neurotoxischen Wirkungsmechanismen ist essentiell, um den Zusammenhang zwischen neurologischen Krankheiten und Neurotoxizität besser zu verstehen. Mit Hilfe dieses Wissens können bessere Testsysteme entwickelt und eine sicherere Risikobewertung für Mensch und Ökosysteme erreicht werden. Im BMBF Projekt-Verbund ToxBox und zahlreichen anderen Studien haben sich Embryonen des Zebrabärblings als ein besonders geeignetes Modell für den Nachweis neurotoxischer Veränderungen erwiesen. Der Einsatz von Fischembryonen bietet dabei die einmalige Chance, Entwicklungstoxizität (Teratogenität) und Neurotoxizität in einem Testverfahren zu kombinieren (Stichwort "Entwicklungsneurotoxizität; DNT") (Alderton 2008). Zebrabärblinge werden bisher sehr erfolgreich eingesetzt, um human teratogene Stoffe zu identifizieren (Braunbeck et al. 2014). In Studien wurde auch gezeigt, dass Substanzen, welche einigen neurotoxisch in Säugertiermodellen wirken, auch anhand von Zebrabärblingstudien als neurotoxisch identifiziert werden können (Ton, Lin, and Willett 2006). Die Anzahl der als neurotoxisch klassifizierten Substanzen ist allerdings aufgrund der Langwierigkeit bisheriger Tests mit Nagermodellen sehr gering und weitere Studien sind nötig, um sowohl die genaue Eignung als auch die Grenzen von Zebrabärblingen als Screening-Modell zur Untersuchung von DNT zu ermitteln (Siehe TP 2 und TP 4). Aufgrund der hohen genetischen und funktionellen Ähnlichkeit zwischen Zebrabärblingen und Menschen, werden Zebrabärblinge auch erfolgreich in der Medizin zur Studie von Krankheitsursachen und zur Identifikation potenzieller Medikamente und Therapien eingesetzt
(Alderton 2008). Bisher wurden zudem Studien zu einer Vielzahl neurologischer Krankheiten durchgeführt. Inwieweit umweltrelevante Substanzen pathologische Mechanismen (z.B. Genoder Proteinveränderungen) beeinflussen können, wurde bisher aber nur unzureichend untersucht (Bretaud, Lee, and Guo 2004). Spezifische Tests zur Identifikation von Substanzen mit (neuro)pathologischer Wirkung sind bisher kaum etabliert, aber dringend notwendig, um eine verbesserte Risikobewertung von potenziell neurotoxischen Substanzen durchzuführen. Aufgrund bedeutend längerer Generationszeiten, komplexerer Verhaltensphänotypen und nicht zuletzt ethischer Aspekte, eignen sich Säugermodelle kaum für breite Screening-Verfahren in vivo. Da Zebrabärblinge jedoch bei finalen Tests der Humanpathogenität toxischer Substanzen an ihre Grenzen stoßen, sind solche Testverfahren an Nagermodellen besonders wünschenswert, mit denen die Humanpathogenität sowohl gezielter prognostiziert, als auch mechanistisch analysiert werden könnte. Derzeit liegen vergleichbare Tests jedoch kaum vor. Das Institut für Umweltforschung der RWTH Aachen bzw. ab 10/2019 die neue etablierte Abteilung Evolutionsökologie und Umwelttoxikologie an der Goethe Universität in Frankfurt (Leitung Prof. Dr. Henner Hollert) hat im Bereich verhaltensbasierter Untersuchungen durch ein DFG-gefördertes SeedFunds-Projekt eine auf dem DanioVision System beruhende Methodik zur Verhaltensanalyse von Zebrabärblingen etabliert und verschiedene Pflanzenschutzmittel untersucht und kürzlich an einem wichtigen Übersichtsartikel zur Thematik mitgewirkt (Ford et al. 2021). Sowohl im Rahmen einer Proof-of-Concept Studie mit dem Ökotoxzentrum Eawag-EPFL und dem Fraunhofer Institut IME, als auch durch das BMBF Projekt W3Hydro und das EU Projekt Solutions konnten bereits umfangreiche Erfahrungen mit Verhaltensexperimenten und Transkriptomänderungen gesammelt werden (Nüßer et al. 2016; Sonnack et al. 2015). Zudem gibt eine breite Expertise im Bereich der olfaktorischen Toxikologie in Fischen durch ein kürzlich abgeschlossenes DBU-Promotionsprojekt (Volz, S., Schiwy, S. and Hollert 2015, Volz et al. 2019, 2020) unter Förderung des DBU Förderschwerpunktes Ökotoxikologie. Dr. Legradi konnte bereits im Kontext des EU geförderten Projektes Denamic Verhaltensprofile für verschiedene Chemikalien erstellen und vergleichen (Abbildung 1 A) (Legradi et al. 2014). Die Autoren des Abschlussberichteshaben auch langjährige Erfahrung in der Analyse von toxikogenomischen Daten (Ho et al. 2013; Yang et al. 2007; Kosmehl et al. 2012; Bluhm et al. 2014; Brinkmann et al. 2016). Dr. Legradi und Kollegen haben in der Vergangenheit erfolgreich neue Methoden zur quantitativen Analyse von Metaboliten aus verschiedenen Neurotransmittersystemen in Zebrabärblingembryonen entwickelt (Abbildung 1B Tufi et al. 2016). Auch Veränderungen auf Proteinebene konnten nachgewiesen werden. Veränderungen neurobiologisch relevanter Gene nach Exposition konnten sowohl von Dr. Legradi (Abbildung 1C), als auch in der Gruppe um Prof. Hollert gezeigt werden (z.B. Chen et al. 2016, Gundlach et al. 2021). Für die angestrebte Etablierung spezifischer in vivo Analysemethoden im Mausmodell weisen sowohl Prof. Spehr, als auch Prof. Kampa langjährige Expertise bezüglich der physiologischen Analyse neuronaler Prozesse im adulten (u.a. Fluegge et al. 2012; Cichy et al. 2015; Gorin et al. 2016; Roth, Helmchen, and Kampa 2012; Kampa, Letzkus, and Stuart 2006; Göbel, Kampa, and Helmchen 2007) wie im neonatalen Tier (Bitzenhofer et al. 2015) auf. Darüber hinaus hat Prof. Spehr bereits umfangreiche Erfahrung bei der elektrophysiologischen und verhaltensphänotypischen Beschreibung bislang unbekannter endogener Substanzen (Kaur et al. 2014; Ferrero et al. 2013; Rivière et al. 2009). Auch die mechanistische Analyse molekularer Interaktionen von Rezeptoren,

Ionenkanälen, etc. gehört zum umfangreichen analytischen Repertoire am Lehrstuhl für Chemosensorik (Triller et al. 2008; Veitinger et al. 2011; Spehr et al. 2003; Henkel et al. 2014).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während der Laufzeit des Projektes wurde mit verschiedenen Stellen innerhalb und außerhalb des Verbunds zusammengearbeitet. Im Folgenden wird eine Auflistung der Stellen mit kurzer Beschreibung der Art der Zusammenarbeit eingefügt:

Vrije Universiteit Amsterdam, VUE, Department Environment and Health, Niederlande Prof. Pim Leonards

Dr. Jessica Legradi (Co-PI)

Helmholtz-Zentrum Umweltforschung (UFZ) Leipzig

Dr. Riccardo Massei, Dr. Meliz Muz, Dr. Eberhard Küster, Dr. Stefan Scholz, PD Dr. Werner Brack

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, France Prof. Dr. Xavier Cousin

Örebro University, Sweden, School of Science and Technology Prof. Dr. Steffen Keiter

Umweltbundesamt UBA Bad Elster & Dessau

Jochen Kuckelkorn, Dr. Tamara Grummt (verstorben), Dr. Gerd Maack

UKA - Universitätsklinikum Aachen

Dr. Christian Preisinger, Dr. Bernd Denecke (verstorben)

University of Portsmouth, School of Biological Sciences, Groß-Britannien

Prof. Dr. Alex Ford

Institut für Siedlungswirtschaft (ISA) der RWTH Aachen

Prof. Volker Linnemann

Department of Psychiatry, Psychotherapy and Psychosomatics, University Hospital **RWTH Aachen and JARA-Translational Brain Medicine** PD Dr. Michael Paulzen

Alexianer Hospital Aachen Dr. Marc Augustin

RWTH Aachen University, Institute of Physiology (Neurophysiology) Prof. Dr. Angelika Lampert

II Eingehende Darstellung

NEUROBOX Verwendungsnachweis

01.03.2017 - 31.12.2020

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Zuwendungen wurden gemäß dem Finanzierungsplan verwendet. Sie dienten zur Deckung der Personalausgaben, zur Finanzierung der benötigten Verbrauchsmittel und zum Ausgleich von Aufwendungen für Reisekosten. Der zahlenmäßige Nachweis über die Verwendung der Zuwendungen mit Angabe der wichtigsten Positionen und die die dazugehörigen Belege sind durch den Zuwendungsempfänger RWTH bereits am 05.05.2021 und 23.06.2021 postalisch über die Drittmittelstelle Bund der RWTH Aachen an den Projektträger Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Bereich Wassertechnologie übermittelt worden. Hier eine Zusammenfassung der entstandenen Kosten.

Pos.	Ents insges	Entstandene Ausgaben insgesamt bis einschl. 2020			Gesamtfinanzierungsplan		
	162420	163310	Σ	162420	163310	Σ	
0812	342.575,17 €	118.888,96 €	461,464,13 €	320,036,00 €	122 324 00 €	442 360 00 6	
0817			0.00 €		122.02 1,00 0	0.00 €	
0820			0.00 €			0,00 0	
0822	1.432,74 €	1.340,69 €	2.773.43 €	1.387.50 €	1 387 50 F	2 775 00 6	
0831			0.00€		1.007,00 0	0.00 €	
0834	and the second		0.00€			0,00 6	
0835	56.461.02 €		56,461,02 €	59 429 00 E	The second second	59 429 00 6	
0843	32.551.53 €	71.178.36 €	103 729 89 €	50 571 00 E	60.000.00 €	110 571 00 6	
0846	11.591,59 €	2.846.61 €	14 438 20 €	15 600 00 E	10 600 00 €	26 200 00 6	
0850	49.766,28 €	24.997,56 €	74,763,84 €	50.000.00 €	25 000 00 €	75 000 00 6	
Summe:	494,378,33 €	219 252 18 €	713 630 51 6	497 023 50 E	210 311 50 6	716 225 00 6	

02WRS1419C

	162420	163310	Σ
Entstandene Ausgaben 2020	494.378,33 €	219.252,18 €	713.630.51 €
Anteil Bund/Zuweisung/Ver- waltungsvereinbarung	494.378,33 €	219.252,18 €	713.630,51 €
zzgl. Projektpauschale	98.875,67 €	43.850.44 €	142,726,10 €
intern: Zwischensumme	593.254,00 €	263.102,62 €	856.356.61 €
Zahlung Bundesanteil/ Zuweisung/Verwal- tungsvereinbarung (einschl. Kassenbestand 2019)	596.428,20 €	263.173,80 €	859.602,00 €
intern (Zahlungen Mittel abzgl. PP)	497.023,50 €	219.311,50 €	716.335,00 €
intern (Zahlungen PP)	99.404,70 €	43.862,30 €	143.267.00 €
Kassenbestand am 31.12.2020	3.174,20 €	71,18 €	3.245.39 €
intern: davon Projektmittel	2.539,36 €	56,95 €	2.596.31 €
intern: davon Projektpauschale	634,84 €	14,24 €	649.08 €

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt anhand der Meilensteine:

M1: Übersicht von Verhaltenstests mit Zebrabärblingen bis zu einem Alter von 5 Tagen

Zebrabärblings-Embryonen zeigen eine große Anzahl verschiedener Verhaltensweisen, die alle in unterschiedlichen Entwicklungsstadien auftreten. Diese Verhaltensweisen korrelieren mit dem Fortschreiten der Entwicklung des Nervensystems (Abbildung 1). Teile der in diesem Meilenstein dargestellten Befunde wurden auch bei Legradi et al. (2018) und Ford et al. (2021) international von uns publiziert.

Der Spontanbewegungs-Assay zielt darauf ab, das erste vom Zebrabärbling-Embryo gezeigte Verhalten zu untersuchen und wurde in der Literatur ausführlich beschrieben (Brustein et al., 2003; Drapeau et al., 2002a; Saint-Amant, 2006; Saint-Amant & Drapeau, 1998; Saint-Amant & Drapeau, 2000, 2001). Die Spontanbewegung in diesem frühen Stadium ist durch laterale, alternierende Seite-zu-Seite-Bewegungen des Schwanzes gekennzeichnet (Brustein et al., 2003; Saint-Amant & Drapeau, 1998). Sie wird von einem einfachen neuronalen Schaltkreis abgeleitet, der elektrische Depolarisationen über Gap Junctions propagiert und somit unabhängig von chemischer Neurotransmission ist (Downes & Granato, 2006; Drapeau et al., 2002a; Saint-Amant, 2006). Wenn Embryonen bei 28,5°C aufgezogen werden, treten die ersten spontanen Schwanzkontraktionen bei 17 Stunden nach der Befruchtung (Englisch hours post fertilizaiton (hpf)) auf, was mit dem Auftreten der ersten Acetylcholinrezeptor (AChR)-Cluster zusammenfällt (Drapeau et al., 2002a; Liu & Westerfield, 1992; Saint-Amant & Drapeau, 1998). Der Höhepunkt der spontanen Schwanzbewegung wird bei 19 hpf erreicht, gefolgt von einer allmählich abnehmenden Aktivität (Saint-Amant & Drapeau, 1998). Bis zu einem Entwicklungsstadium von 21 hpf ist die spontane Schwanzbewegung das Resultat von periodischen Depolarisationen und unabhängig von externen Stimuli (Brustein et al., 2003). Mit fortschreitender Entwicklung von Gehirn und Rückenmark werden jedoch zusätzliche neuronale Schaltkreise in dieses Verhalten integriert, die komplexere Verhaltensweisen ermöglichen, und von außen beeinflusst werden können. Die spontane Bewegung des Schwanzes ist für den sich entwickelnden Bewegungsapparat der Wirbeltiere von großer Bedeutung, da es Zelldetermination zu beeinflussen scheint (Saint-Amant, 2006). Des Weiteren ist die elektrische Kopplung an der Bildung chemischer Synapsen beteiligt und es wurde gezeigt, dass eine Störung der frühen Spontanbewegung die Führung motorischer Axone in Hühner-Embryonen beeinträchtigt, sowie den Aufbau spinaler motorischer Netzwerke in der Maus stört (Feller, 1999; Hanson & Landmesser, 2004; Myers et al., 2005; Roerig & Feller, 2000).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden die Verhaltenstests Photomotorresponse (PMR) und der sogenannte touch response Test entwickelt (Brustein et al., 2003; Drapeau et al., 2002a). Der PMR beschreibt die nicht-visuelle Reaktion des embryonalen Zebrabärblings auf einen starken, kurzen Lichtblitz und wird vermutlich vom Hinterhirn gesteuert und durch Opsin-basierte Photorezeptoren kontrolliert (Kokel et al., 2013). Bei 28°C aufgezogene Embryonen zeigen bereits bei 27 hpf eine erste Reaktion auf Licht, die aber noch nicht zu einer PMR-Erregung führt. Eine zuverlässige PMR-Antwort kann erst ab 30-40 hpf induziert werden. Nach 40 hpf nimmt das Ausmaß der PMR-Erregung ab und verschwindet bis 50 hpf (Kokel et al., 2013). Die PMR als solche besteht aus vier Phasen: der Prä-Stimulus oder der basalen Aktivitätsphase, der Latenzphase, der Erregung und der Refraktärphase. Während der Prä-Stimulus-Phase zeigen

die Embryonen eine geringe basale Aktivität mit seltenen Körperbewegungen im Chorion. Die Latenzphase (1-2s) ist die Zeit zwischen dem Lichtblitz und der Erregungsphase (5-7 s). Die Erregungsphase ist durch hochfrequente Körperbewegungen gekennzeichnet, gefolgt von einer Refraktärphase. Während der Refraktärphase wird die basale Aktivität unterdrückt und ein zweiter Lichtblitz ruft keine Reaktion bei den Embryonen hervor (Kokel et al., 2010; Kokel et al., 2013). Erst nach weiteren 10 Minuten Adaptation im Dunkeln reagieren die Embryonen wieder auf einen Lichtreiz (Kokel et al., 2010).

Mit dem Touch-Response-Assay kann die embryonale Reaktion auf einen physikalischen Reiz evaluiert werden. Eine erste Reaktion auf Berührung tritt bereits bei ca. 21 hpf auf und führt zu einem kräftigen Schlagen des Schwanzes. In der Zeit bis zu 27 hpf führt eine Berührung des Schwanzes zu einem partiellen Schwanzschlag mit dem Ziel den Embryo vorwärts zu bewegen, während eine Berührung des Kopfes zu einer vollständigen Bewegung führt. Nach 36 hpf ruft die Berührung des Embryos Schwimmbewegungen weg vom Stimulus hervor (Brustein et al., 2003; Downes & Granato, 2006; Drapeau et al., 2002a; Richendorfer et al., 2014). Diese Reaktion tritt auf, sobald chemische Neurotransmission auftritt (Drapeau et al., 2002a; Saint-Amant, 2006). Kurz nach dem Schlüpfen (2-3 (Englisch days post fertilization (dpf)) sind die Embryonen generell inaktiv. Diese langen Perioden der Inaktivität werden nur durch kurze, seltene Episoden des Schwimmens unterbrochen (Brustein et al., 2003; Buss & Drapeau, 2001). Zwischen 3 und 4 dpf wechseln die Embryonen zu einem "Schlag-und-Gleit"-Schwimmen, was der Zeitpunkt ist, an dem prämotorische chemische Synapsen in den neuronalen Schaltkreis integriert werden (Brustein et al., 2003; Drapeau et al., 2002a). Dieser Schritt in der embryonalen (Moto-) Neuronenentwicklung kann mit dem Lokomotionsassay untersucht werden. Mit diesem Assay kann die basale Schwimmaktivität von geschlüpften Zebrabärblings-Embryonen ab 72 hpf beurteilt werden. Um diesen Endpunkt zu bestimmen, werden die Embryonen in einer stabilen Umgebung gehalten, z. B. bei kontinuierlichem Licht ohne zusätzliche Reize wie Dunkelheit (Legradi et al., 2014). Mit fortschreitender Embryonalentwicklung wird die serotonerge Modulation in den neuronalen Schaltkreis integriert, was zu einem nachhaltigeren Schlag-und-Gleit-Schwimmen zwischen 4 und 5 dpf führt (Brustein et al., 2003; Drapeau et al., 2002a). Ab ca. 5 dpf verfügen die Embryonen über eine gefüllte Schwimmblase und das sensorische System, einschließlich des Sehens, wird voll funktionsfähig (in Drapeau et al. 2002, Lindsey et al. 2010). Dies führt zu einer weiteren Steigerung der embryonalen Schwimmfähigkeiten (Granato et al., 1996).

Der Hell-Dunkel-Transitions Test (LDT) bewertet die embryonale Reaktion auf einen visuellen Reiz und untersucht somit die Funktion des sensorischen Systems und die Fähigkeit des Organismus zu reagieren (Burgess et al., 2010; Burgess & Granato, 2007). Bei diesem Test wird der visuelle Stimulus in Form von wechselnden Beleuchtungsbedingungen übermittelt, die entweder Licht oder Dunkelheit sind. Embryonen, die ein "normales" Verhalten zeigen, zeigen eine geringe Aktivität während der Lichtperioden und erhöhen ihre Aktivität beim Wechsel zur Dunkelheit (Irons et al., 2010a; MacPhail et al., 2009). Diese Verhaltensreaktion wird heute häufig genutzt, um die Wirkung neurotoxischer oder -aktiver Substanzen auf das Nervensystem des Zebrafischembryos zu beurteilen (Dach et al., 2019; Truong et al., 2014; Velki et al., 2017). Die biologischen Hintergründe für dieses Verhalten sind jedoch nicht vollständig geklärt. Eine gut

begründete Hypothese ist, dass Embryonen Licht suchen, um die Nahrungsaufnahme sicherzustellen (Burgess et al., 2010; Burgess & Granato, 2007). Beim Wechsel in die Dunkelheit kommt es zu großräumigen C-Drehungen (O-Biegungen, ca. 150°), die den Embryo in Richtung der Lichtquelle umorientieren. Diese Reaktion wird höchstwahrscheinlich durch reticulospinale Neuronen ausgelöst, während Routinedrehungen (C-Biegungen) und Schreckreaktionen während der Lichtperiode offenbar durch Mauthnerzellen vermittelt werden (Burgess & Granato, 2007). Die Reifung des visuellen Systems erlaubt auch die Anwendung von fortgeschritteneren Ansätzen wie dem Bouncing Ball Assay. Bei diesem Assay werden Embryonen auf einem Bildschirm platziert und mit einer oder mehreren farbigen Scheiben konfrontiert, die entweder stationär bleiben oder sich von links nach rechts bewegen ("bouncing"). Mit diesem Assay kann das embryonale Vermeidungsverhalten untersucht werden (Colwill & Creton, 2011; Pelkowski et al., 2011). Nicht-visuelle Assays wie der akustische/vibratorische Stimulus sind weitere Beispiele für Assays, die in 5 dpf-Embryonen anwendbar sind. Zur gleichen Zeit, in der das Sehen funktionsfähig wird, sind Embryonen in der Lage zu hören und können daher auf akustische Reize reagieren (Zeddies & Fay, 2005). Im Akustik-/Vibrationsassay wird diese Fähigkeit der Embryonen durch Klopfen gegen das Testgefäß, z.B. eine Multiwellplatte, getestet. Neben dem Klopfen können akustische/vibratorische Stimuli als Schall, übersetzt in Lautsprechervibrationen, abgegeben werden (Kopp et al., 2018). Auf den Stimulus reagieren Embryonen mit einer Schreckreaktion, gefolgt von einem Fluchtverhalten (Burgess & Granato, 2007; Faria et al., 2019). Die Reifung des visuellen Systems ermöglicht darüber hinaus zusätzliche visuell basierte Assays wie die optomotorische Reaktion (OMR) oder die optokinetische Reaktion (OKR) (Brockerhoff, 2006; Orger et al., 2004).



Abbildung 1: Verhaltensweisen während der Zebrabärblings-Embryonalentwicklung in Stunden nach der Befruchtung (hpf) und das Auftreten der jeweiligen Verhaltensweisen. Der violette Pfeil zeigt das durch Gap Junctions vermittelte motorische Verhalten und der orangefarbene Pfeil zeigt das durch synaptische Übertragung vermittelte motorische Verhalten. Erstellt mit BioRender.com

M2: Kombination der Methoden zu einem Screening-Verfahren

Um geeignete Assays für das Screening einer großen Menge an neurotoxischen Substanzen in kurzer Zeit zu identifizieren, wurden die in M1 identifizierten Assays in Bezug auf ihre Hochdurchsatzpotenzial ausgewählt und kombiniert. Dementsprechend mussten die Assays einfach in Bezug auf die Ausrüstung und die Vorbereitungen im Vorfeld durchzuführen sein und einen geringen Zeitaufwand erfordern. Um die Wirkung der Substanzen während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung zu identifizieren, wurden die Assays so ausgewählt, dass sie Verhaltensweisen adressieren, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (z.B. Mauthner-Neuron gesteuert etc.) und alle Entwicklungsschritte bis 5 dpf abdecken. Dies ist der längste Zeitraum, in dem Embryonen untersucht werden können, ohne dass es sich um einen Tierversuch handelt (EU-Richtlinie 2010/63/EU). Der erste Assay, der für diesen Ansatz ausgewählt wurde, war der Spontanbewegungsassay. Dieser Assay deckt den Beginn des embryonalen (Motor-) Verhaltens ab und spiegelt die Entwicklung der ersten neuronalen Schaltkreise in den Embryonen wider. Außerdem ist der Assay einfach durchzuführen, zeitsparend und leicht auszuwerten. Im Gegensatz zur Spontanbewegung stellt die PMR die erste Reaktion auf Licht dar und wurde als ein zuverlässiges und leistungsfähiges Werkzeug zum Nachweis von Einflüssen von Chemikalien auf den sich entwickelnden Embyro beschrieben (Kokel et al., 2013; Kokel et al., 2010). Darüber hinaus ist dieser Assay vergleichsweise einfach und schnell durchführbar, was ihn für den Hochdurchsatz-Screening-Ansatz geeignet macht. Um die Reaktion der Embryonen auf einen physikalischen Stimulus zu untersuchen, wurde der Touch-Response-Assay gewählt. Auch dieser Assay ist in der Literatur umfangreich beschrieben und die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend geklärt (siehe Review von Berg et al., 2018). Allerdings ist die quantitative Bewertung der touch response mit einem automatisierten Screening-Tool schwierig und zeitaufwändig. Daher wurde ein qualitativer Bewertungsansatz angewendet, der es erlaubt, den Durchsatz zu erhöhen. Des Weiteren wurde die Schwimmfähigkeit der Embryonen als der nächste Endpunkt in den Screening-Ansatz integriert. Um möglichst viele Informationen zu erhalten, wurden zwei weitere Assays hinzugefügt. Der erste Test war der Lokomotionsassay, der die Bewegungsaktivität der Embryonen ohne einen Stimulus beurteilt. Dieser Test ist sehr einfach durchzuführen, kann in 96-Well-Platten durchgeführt werden, erfordert keine zusätzliche Ausrüstung und ist leicht auszuwerten. Um das Verhalten nach einem Stimulus zu testen, wurde der LDT gewählt. Der Assay ist ebenfalls einfach durchzuführen, zeitsparend (Durchführung in 96-Well-Platten) und in der Literatur gut beschrieben. In Bezug auf Letzteres ermöglichte uns dies, unsere Ergebnisse im Lichte der bereits vorhandenen Literatur zu diskutieren.

Das übergeordnete Ziel war es, die oben ausgewählten Assays schnell und effizient durchzuführen, um neurotoxische Wirkungen in Zebrabärblingen während der Embryonalentwicklung zu bewerten. Um die Effizienz zu erhöhen, wurde beschlossen, die einzelnen Assays in einer zeitlichen Reihenfolge aneinanderzureihen, beginnend mit dem Spontanbewegungsassay und endend mit dem LDT-Test, wobei in allen Assays dieselben Embryonen verwendet wurden. Dieser Ansatz hatte mehrere Vorteile im Vergleich zur parallelen Durchführung der einzelnen Assays. Erstens war es durch die Verwendung der gleichen Embryonen in allen Assays möglich, die Substanzeffekte während der gesamten Embryonalentwicklung zu beobachten und Effekte auf verschiedene Teile des Nervensystems zu testen. Darüber hinaus sparte dieser Ansatz Zeit, Testorganismen und die Menge an Testsubstanz, da die Exposition nur einmal bei ca. 2 hpf initiiert werden musste und die exponierten Embryonen bis 5 dpf getestet werden konnten. Zusätzliche Effizienz wurde erreicht, indem die Spontanbewegung und die PMR zu einem Assay kombiniert wurden und somit zwei Assays auf einmal durchgeführt werden konnten. Außerdem wurde beschlossen, den Touch-Response-Assay bei 4 dpf durchzuführen, um den Stress für die Embryonen durch die Handhabung zu reduzieren, aber auch um Zeit zu sparen. Ein Grund für diese Entscheidung liegt darin, dass Embryonen, die bei 26° C aufgezogen wurden um 72 hpf schlüpfen (Kimmel et al., 1995). Um einen Dechorinierungsschritt zu vermeiden, da dieser den zeitlichen Aufwand erhöht hätte, wurde der touch response assay bei 96 hpf (4 dpf) durchgeführt. Abbildung 2 zeigt den endgültigen Ansatz, der in dieser Studie verwendet wurde. Der Ansatz ist zeit- und ressourceneffizient, während gleichzeitig ein großer Satz an Verhaltensdaten gewonnen wird. Diese wurde anschließend genutzt werden um ein Effekt-Profil der Testsubstanzen auf das Verhalten zu generieren (Abbildung 3).



Abbildung 2: Zeitplan für das Screening.- Schematischer Zeitplan für die Durchführung der jeweiligen Verhaltensassays im Rahmen des Screening-Ansatzes über eine Woche. Erstellt mit BioRender.com



Abbildung 3: Heatmaps zeigen die log₂-transformierten Daten der mittleren Zeit, in der sich Embryonen nach Exposition mit der jeweiligen Testsubstanz bewegen (A-F). Die Daten wurden auf die Lösemittelkontrolle (= SC) normiert. Bitte beachten Sie, dass die Farbskala bei den jeweiligen Substanzen unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. NC= Negativkontrolle.

M3: Darstellung potenzieller humaner Biomarker für neurotoxische Effekte

In diesem Arbeitspaket wurden neue Biomarker der Neurotoxizität ermittelt und auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Zu Beginn des Projektes fokussierten wir uns auf genetische Marker. In der Literatur wurden mögliche Biomarkergene für Neurotoxizität recherchiert. Die gewählten Gene sind dafür bekannt bei der Entwicklung oder der Funktion des Nervensystems eine Rolle zu spielen. Des Weiteren wurden Gene ausgewählt, welche bereits in anderen Studien eine Regulation durch toxische Stoffe zeigten. Bisher wurden insgesamt 27 verschieden Gene selektiert. Weitere Biomarkergene, welche mit der Entstehung von humanen, neurologischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden (ADHD, ASD) und im Zebrabärbling etabliert sind, wurden durch Kontakt zu Dr. Will Norton (Leicester University) ermittelt (Tabelle 1). Im Rahmen der OMICs Analysen wurde auch nach diesen Genen gesucht, um ggf. einen Link zwischen Chemikalienexposition und neurologischen Erkrankungen herzustellen.

Tabelle 1: Liste von Genen, welche in Zusammenhang mit der Entwicklung von ADHD und ASD stehen und im Zebrafischmodel validiert sind.

Neurology-linked genes

1.	gabra1	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha1
2.	gabra3	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha3
3.	fkbp5	FKBP prolyl isomerase 5
4.	per3	period circadian clock3
5.	gad	glutamate decarboxylase 1b
6.	cry1bb	n.a.
7.	penka	proenkephalin a
8.	penkb	proenkephalin b
9.	bdnf	brain derived neurotrophic factor
10.	slc6a3	solute carrier family 6 member 3
11.	slc6a4a	solute carrier family 6 member 4a
12.	mao	monoamine oxidase
13.	fosab	Regultaion der Transkription am RNA-Polymerase II Promotor
14.	mbpb	Myelin basic protein
15.	chna1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)
16.	tuba1a	Teil des Mikrotubulin-Zytoskeletts in entwicklenden Axonen und
Dendri	iten	
17.	gabra1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
18.	sertb	solute carrier family 6 member 4b, Serotonin Transporter
19.	htr1aa	Serotonin 1A receptor
20.	hsbp11	Heat shock protein
	-linked genes	

ADHD-linked genes

21.	lphn3.1	adhesion G protein-coupled receptor L3.1
-----	---------	--

22. nos1 nitric oxide synthase 1 (neuronal)

ASD-	linked	genes

- 23. reelin n.a. (ENSDARG00000098969)
- 24. dab1a DAB adaptor protein 1a
- 25. vldlr1 n.a. (ENSG00000147852)
- 26. cntnap2a contactin associated protein 2a
- 27. cntnap2b contactin associated protein 2b

Ein Teildatensatz für 10 dieser Gene (Tabelle 1) wird in Abbildung 4 dargestellt und lässt eine signifikante Regulation erkennen.



Abbildung 4: Expression der Zielgen-Transkripte von Oxazepam exponierten Embryonen im Vergleich zu Methanol exponierten Embryonen. Die Werte der Expression jedes Gentranskriptes wurden auf die Expression der Referenzgene rpl8 und rpl13 normalisiert. Die Werte zeigen den gemittelten Fold-Change (log2) von drei Replikaten im Vergleich zu den Kontrollen, in denen Embryonen gegenüber Methanol exponiert wurden (0.29 %). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittels der 2'delta Cp-Werte, normalisiert auf die Expression der Referenzgene rpl8 und rpl13. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede verglichen mit der Kontrolle (p<0.05). Exposition von 4-5 dpf (24h Exposition).

M4: Ermittlung von Biomarkern zur Detektion von Neurotoxizität abgeleitet aus -omics Studien

Für die Selektion weiterer human-relevanter Biomarker wurde ein breit angelegter OMICS-Approach mit den Embryonen des Zebrabärblings durchgeführt. Dieser beinhaltete eine nontarget Transkriptom- und Proteom-, sowie eine targeted Metabolomuntersuchung (Abbildung 5). Im Hinblick auf ökologisch relevante Aspekte sollten die beobachteten Verhaltensänderungen (M1) in den Embryonen mit molekularen Veränderungen korreliert werden. Mit diesen "non-target" Methoden wurden zwei verschieden Zeitpunkte (30 hpf und 5 dpf) in der embryonalen Entwicklung beleuchtet. Als Testsubstanzen wurden Insektizide aus der Gruppe der Organophosphate und der Carbamate gewählt da deren ursprünglicher Wirkmechanismus gut in der Literatur beschrieben wurde, molekulare und makromolekulare Effekte jedoch weniger detailliert untersucht wurden. Außerdem wurden verschiedene endokrine Disruptoren untersucht um deren potentiellen Einfluss auf das neuronale System detektieren und einem besseren Verständnis ihrer Wirkung beitragen zu können.



Abbildung 5: Implementierung eines multiOMICs-Screens zur DNT-Bewertung. Die Abbildung zeigt die verschiedenen molekularen Ebenen, die mit OMIC-Methoden untersucht wurden. In dieser Arbeit wurden das Transkriptom, Proteom und Teile des Metaboloms (Neurotransmitter) untersucht. Die Genomik wurde in dieser Abbildung mit einbezogen, um die verwendeten Methoden in einen Kontext zu stellen. Die Abbildung zeigt weiterhin, dass, ausgehend vom Genom, jede untersuchte Ebene einen Aufstieg zu einer höheren Ebene der biologischen Organisation darstellt.

Auf der Transkriptomebene von 30 hpf Embryonen wurden keinerlei Veränderungen nach einer Exposition mit den Substanzen Diazinon, Paraoxon-Ethyl/-Methyl oder Dichlorvos, festgestellt. Diese Substanzen wurden für die Transkriptomanalyse verwendet, da sie im Screening-Ansatz eine Verhaltensänderung bei den Embryonen auslösten. In 5 dpf Embryonen resultierte die Exposition gegenüber Dichlorvos und Paraoxon-Methyl in einer veränderten Transkription von Gene des Energiemetabolismus, der oxidativen Stressantwort, der Muskelentwicklung und des visuellen Systems. Wohingegen keine Effekte nach einer Exposition gegenüber Diazinon oder Paraoxon-Ethyl detektiert werden konnten.

Die Analyse des Proteoms von 5 dpf Embryonen die gegenüber Diazinon, Dichlorvos, Paraoxon-Ethyl/-Methyl und MEHP exponiert worden waren, wiesen multiple Veränderungen auf. Alle Substanzen übten einen Einfluss auf generelle zelluläre Prozesse wie Transkription oder Translation aus. Des Weiteren wurden zahlreiche Dysregulationen im Bereich der synaptischen Signaltransmission, im sensorischen System und speziell im visuellen System sowie in der Entwicklung des Muskelapparates festgestellt. Hierbei wurde die größte Zahl differenziell regulierter Proteine in Embryonen detektiert, die gegenüber MEHP und Paraoxon-Methyl exponiert worden waren (Abbildung 6).



Abbildung 6: Heatmap der Proteomdaten von 5 dpf-Embryonen. Die Daten werden als log2-Fold-Change-Werte dargestellt. Die Zeilen (Proteine) und Spalten (Proben) wurden durch hierarchisches Clustering gruppiert. Die entsprechenden Dendrogramme werden auf der linken Seite der Heatmap bzw. am oberen Rand angezeigt. Die Farbskala reichte von blau (stark unterrepräsentiert) bis dunkelrot (stark überrepräsentiert). In der Heatmap wurden Lösungsmittelkontrolle SC-(DMSO) und die Negativkontrolle NC-Daten (neg) zusammen geclustert, was zeigt, dass die Proben der jeweiligen Bedingung vergleichbar waren, aber auch, dass SC- und NC-Behandlung zu ähnlichen Proteinexpressionsprofilen führten. Die Proteomdaten von 1 und 5 μ M MEHP und 10 μ M Paraoxon-Methyl clusterten zusammen, was auf vergleichbare Ergebnisse für diese Behandlungen hinweist. Die Behandlung mit Dichlorvos schien unterschiedliche Effekte im Vergleich zu z.B. 10 μ M Paraoxon-Methyl zu verursachen. In Bezug auf die anderen Behandlungsbedingungen wurden Wiederholungen derselben Behandlung nicht zusammen geclustert, was auf Unterschiede zwischen ihnen hindeutet.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Testsubstanzen auf die verschiedenen Neurotransmittersysteme ergab eine signifikant gesteigerte Konzentration des Neurotransmitters Glutamat und dessen Vorstufe Glutamin in 30 hpf Embryonen exponiert mit Diazoxon und Paraoxon-Methyl (Abbildung 7). Da sowohl Glutamat als auch Glutamine zahlreiche Funktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus aufweisen, sind weitere Untersuchungen notwendig, welche die Relevanz dieser Ergebnisse im Bezug auf neurotoxische Effekte verifizieren. In 5 dpf Embryonen resultierte die Exposition mit Diazoxon und Paraoxon-Methyl in signifikant

gesteigerten Konzentrationen von Serotonin, wohingegen die endokrin wirksamen Substanzen (MEHP, TDCPP, 4-NP) zu einer signifikanten Erhöhung der GABA-Level führte (Abbildung 7).



Abbildung 7: Heatmap und hierarchisches Clustering von Neurotransmittern/Vorläufern für die jeweiligen Behandlungen. Die Daten sind als log2 fache Änderungen relativ zu der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (solvent control SC) dargestellt. "ME" kennzeichnet Proben, die von 30 hpf-Embryonen stammen ("E" = früh) und "M" kennzeichnet Daten von 5 dpf-Embryonen.

Anhand der durchgeführten functional annotation Analysen und den nachfolgenden pathway enrichments konnten keine übereinstimmenden Biomarkergene oder -proteine identifiziert werden. Allerdings wurden übereinstimmende und funktional verwandte pathways detektiert. Diese wurden genutzt um, basierend auf bereits existierenden Informationen, einen adverse outcome pathway (AOP) zu konstruieren. Beispielhaft ist dies in Abbildung 8 dargestellt. Der abgebildete AOP-Ansatz bezieht sich auf die Daten, die anhand der Exposition mit Dichlorvos in 5 dpf Embryonen erhoben wurden.



Abbildung 8: Die Auswirkung von Dichlorvos auf verschiedene Ebenen der Organisation. Die Abbildung zeigt die Auswirkung von 30 µM Dichlorvos auf verschiedene Ebenen der Organisation innerhalb von 5 dpf alten Zebrafischembryonen. Farbige Kästchen stellen eigene, interpretierte Daten dar, während durchscheinende Kästchen Informationen aus AOPs (AOP ID 16) oder Literatur (Beal, 1995; Faria et al., 2015; Peña-Llopis et al., 2003) anzeigen. Die jeweiligen Farben veranschaulichen die verschiedenen Ebenen der Organisation. Weiterhin implizieren gestrichelte Linien vermutete, durchgezogene Linien verifizierte Verbindungen zwischen den verschiedenen Organisationsebenen.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Detektion bestimmter Biomarker nicht möglich war. Dies hängt auch mit der geringen Zahl von detektierten Effekten auf der Transkriptomebene zusammen. Da sich zudem die Ergebnisse von OMIC Studien verschiedener Labore deutlich unterscheiden empfehlen wir Pathway-basierte anstatt Biomarker-basierte Bewertungen zu nutzen. Diesbezüglich besteht noch Forschungsbedarf da noch Pathway-basierte trigger Werte bestimmt und festgelegt werden müssen.

Fazit

Die durgeführten Untersuchungen zum Verhalten der Zebrabärblingsembryonen zeigen, dass sich dieses für dein Einsatz in einer Screening-Testbatterie eignet. Bedingt durch die zeitliche Abfolge der Motoneuronalenentwicklung konnten mehrere Tests kombiniert werden. Dadurch war es möglich die Embryonen vom Beginn der Motoneuronalenentwicklung bis 5 Tage nach der Befruchtung zu untersuchen. Dies ermöglichte einen stark gesteigerten Testdurchsatz bei gleichzeitig minimalem Organismeneinsatz. Neben einer gesteigerten Effizienz konnte somit im Sinne des 3R-Prinzipes eine Reduktion erreicht werden. Durch eine durchgängige Untersuchung der Zebrabärblingsembryonen war es zudem möglich die DNT-Effekte der Testsubstanzen mit fortschreitender Entwicklung festzustellen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die Effekte von Dichlorvos auf die Motoneuronalentwicklung früh manifestieren. Aktuell gibt es international zahlreiche Bestrebungen Tierversuche zu reduzieren, beispielsweise im Rahmen des Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Diesbezüglich wurde das Verhalten von Zebrabärblingsembryonen bereits als alternative *in vivo* Methode zur Detektion von DNT vorgeschlagen. Das hier entwickelte Screeningverfahren könnte daher als Teil eine DNT-IATA Anwendung finden.

Die eingesetzten OMIC Methoden hatten zum Ziel die molekularen Mechanismen der DNT zu untersuchen und Biomarker für zukünftige Screens zu identifizieren. Mit Hilfe diese Methoden konnten diverse Einflüsse der Testsubstanzen auf verschiedenen, molekularen Ebenen in den Zebrabärblingsembryonen festgestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass Veränderungen im Schwimmverhalten, nach einer Exposition mit AChE inhibierenden Substanzen, auf diverse molekulare Ursachen zurückgeführt werden könnten, z.B. eine muskuläre Entwicklungsstörung oder eine gestörte Reizweiterleitung. Diese könnten im Zusammenhang mit den veränderten Neurotransmittern und Neurotransmittervorstufen stehen, allerdings besteht in diesem Zusammenhang noch Forschungsbedarf. Basierend auf den Ergebnissen diese Studie war es nicht möglich bestimmte Biomarker zu detektieren. Dies lässt sich vor allem durch die geringe Zahl von detektierten Effekten auf der Transkriptomebene zurückführen. Daher wird die Anwendung Pathway-basierter anstatt Biomarker-basierter Bewertungen für neurotoxische Effekte vorgeschlagen. Vor allem im Bezug auf abweichende Ergebnisse von OMIC Studien verschiedener Labore könnte sich dies als Vorteil erweisen. Allerdings besteht diesbezüglich weiterer Forschungsbedarf, da z.B. Pathway-basierte Triggerwerte noch ermittelt werden müssen.

M5 und M6: Untersuchung von neurotoxischen Stoffen mittels Mäusemodell / Identifikation von molekularen Wirkmechanismen zur Entwicklung von Schnelltestverfahren

In M5/M6 sollen durch potenziell neurotoxische Stoffe induzierte sowohl zellmorphologische, als auch neuroanatomisch-strukturelle Veränderungen im peripheren und zentralen Nervensystem von Mäusen analysiert werden. Dabei haben wir uns auf das olfaktorische System als Modell für einen gut charakterisierten neuronalen, sensorischen Schaltkreis fokussiert. Neben klassischen histologischen Methoden konnten wir hier moderne Tissue Clearing Verfahren und Lichtblatt-Mikroskopie etablieren und für eine standardisierte neuroanatomische Beschreibung schadstoffinduzierter Strukturveränderungen nutzen. 3D Rekonstruktionsanalysen sollen dabei zukünftig Aufschluss über neuropathische Veränderungen geben.

Um putative persistente Effekte auf die neuronale Verschaltung und Konnektivität im Peripherund Zentralnervensystem von Mäusen nach Exposition von Abwasser-Neurotoxinen feststellen und quantitativ nachweisen zu können, haben wir – im olfaktorischen System der Maus – einen Assay zur anatomischen und morphologischen Detailanalyse etabliert. Dabei haben wir uns im peripheren Nervensystem auf die Anatomie und Morphologie des Riechepithels und insbesondere der olfaktorisch-sensorischen Neuronen fokussiert. Im Zentralnervensystem galt unser primäres Augenmerk der Verschaltung einzelner Projektionsneurone (Mitralzellen) im *Bulbus olfactorius* sowie der Lokalisation und dreidimensionalen Architektur dessen glomerulärer Strukturen.

Die inhärent äußerst komplexe, dreidimensionale Struktur von einzelnen Zellen und intakten Organen ist zumeist ein deterministischer Faktor für die Zell- bzw. Gewebefunktionalitäten. Daher ist der Bedarf an volumetrischen Bildgebungsverfahren, um die relevanten morphologischanatomischen Strukturen im Detail darzustellen entsprechend groß. Vor allem im Nervensystem wird dies, aufgrund komplexer Zellmorphologie und weitreichenden axonalen Projektionen, besonders deutlich (Richardson and Lichtman, 2015). Klassische Rekonstruktionen serieller Schnittpräparate haben in der Vergangenheit eine Reihe wichtiger Erkenntnisse erzielt. Diese Methoden sind jedoch meist aufgrund sporadisch auftretender Verzerrungen einzelner Gewebeschnitte durch Kompression, Streckung, Faltung, etc. (Richardson and Lichtman, 2015) limitiert, so dass vollständige Rekonstruktionen meist nur von kleineren Gewebekompartimenten möglich und oft artefaktanfällig sind.

Für die Lichtmikroskopie größerer Gewebeblöcke und ganzer Organe stellt die Lichtundurchlässigkeit biologischer Präparate eine dominante Schwierigkeit dar. Neben der Nutzung von Multi-Photonen Mikroskopie, die in nativen Geweben Eindringtiefen bis zu 500 µm ermöglicht, haben sich in jüngster Zeit verschiedene *Tissue-Clearing* Methoden entwickelt, die eine lichtmikroskopische Analyse und molekularen Phänotypisierung ganzer Gewebe und anatomisch intakter Organstrukturen erlauben. Dabei hat jede dieser neuen Techniken ihre eigenen Vor- und Nachteile. Im Kontext des NeuroBox Projektes haben wir uns für die Etablierung der CLARITY Methode (Chung et al., 2013; Chung and Deisseroth, 2013; Organs et al., 2015; Tomer et al., 2014) entschieden, da diese Technik (*i*) für große Gewebevolumina geeignet ist und erlaubt, komplexe synaptische Schaltkreise dreidimensional zu analysieren, (*ii*) dabei relativ schnell und gewebeschonend arbeitet, (*iii*) Im Vergleich zu anderen Methoden (z.B. SCALE (Hama et al., 2011)) keine relevanten Schrumpf- oder Expansionseffekte auftreten, (iv) sowohl vor, als auch nach dem elektrophoretischen *Tissue-Clearing* immunchemische Färbungen möglich sind, und (v) weltweit standardisierte Protokolle zugänglich sind, die Datenreproduktion und -vergleich erlauben.

CLARITY basiert auf der chemischen Transformation intakter Gewebe in eine Hybridstruktur aus Gewebekomponenten und Hydrogel. Während der Fixierung wird das Gewebe mit Hydrogelmonomeren und *Cross-Linker* Molekülen perfundiert. Erhöhung der Temperatur initiiert dann die Polymerisation zu einem Netz aus nativen Proteinen, Nukleinsäuren und Hydrogelpolymeren. Die ausgesparten Membranlipide, die hauptverantwortlich für die Lichtstreuung in biologischen Proben sind, werden elektrophoretisch durch Detergenzien entfernt, so dass nun ein durchsichtiges Gewebe-Hydrogel Hybrid für anatomische Untersuchungen und molekularen Phänotypisierung zur Verfügung steht. Basierend auf publizierten Protokollen der Arbeitsgruppe um Dr. Karl Deisseroth (Tomer et al., 2014) haben wir ein CLARITY-Multiplexsystem aufgebaut (Abbildung 9), dass uns nunmehr erlaubt, parallel in bis zu acht separat angesteuerten Kammern Gewebeproben zu bearbeiten und somit Studien mit relativ hohem Durchsatz durchzuführen.



Abbildung 9: Multiplex-CLARITY. A) Foto des von uns im Rahmen des NeuroBox aufgebauten Projektes CLARITY-Multiplexsystems. Die drei separaten Spannungsquellen erlauben die parallele acht Kontrolle von bis zu Elektrophoresekammern und damit die parallelisierte Aufbereitung verschiedener Proben unter verschiedenen, individuell Konditionen angepassten B) Schematischer Aufbau der von Karl Deisseroth und Mitarbeitern publizierten CLARITY-Multiplexanalge: modifiziert nach (Tomer et al., 2014). C) Detailansicht Kammerblocks des mit sechs angeschlossenen Elektrophoresekammern und zwei nicht angeschlossenen Schlauchpaaren (unten, rechts). Das System wurde 2020 in den "Regelbetrieb" überführt und schafft so die präparative Grundlage für vergleichende neuroanatomische Studien der Auswirkungen von Abwasser-Neurotoxin Exposition.

Aufgrund der Gewebetransparenz wird nach Abschluss des *Tissue-Clearing* Prozesses die optische Eindringtiefe im Regelfall nicht mehr von den Probeneigenschaften, sondern lediglich vom verwendeten Objektiv bestimmt. Entsprechend werden Immersionsobjektive mit weitem Arbeitsabstand und hoher numerischer Apertur benötigt. Hier eignet sich insbesondere die Lichtblattmikroskopie, da zeitintensive Scanning-Verfahren durch digitale Fotographie ersetzt werden können. Wir konnten so eine Beschleunigung der Datenakquise um den Faktor 20 erreichen, so dass beispielsweise für die Aufnahme eines ganzen Mausgehirns nur noch etwa 12

Stunden (statt etwa 10 Tagen) benötigt wurden. Dies ist ein immenser Fortschritt, der aber nach wie vor deutlich verbessert werden muss, um gegebenenfalls den Einsatz vergleichbarer Methoden "im Feld" bzw. im hohen Durchsatz möglich zu machen. Um große Proben und ganze Organe dreidimensional abbilden zu können, ist dabei weiterhin die Aufnahme optischer Schnitte essentiell.

Im NeuroBox Projekt konnten wir nun - als "Proof-of-Principle" Experiment - parallel anatomische Untersuchungen bestimmter neuronaler Subpopulationen durchführen, um Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der einzelnen Neuronenpopulationen einerseits unter Kontrollbedingungen beziehungsweise andererseits in deren Dysfunktion nach Schadstoffexposition zu erhalten. Die Ergebnisse sind dabei äußerst vielversprechend, da es uns erstmals gelungen ist, exakt dreidimensional aus intakten Geweben rekonstruierte Strukturen des olfaktorischen Systems – sowohl im Zentralnervensystem (olfaktorischer Bulbus; Abbildung 10), als auch im Riechepithel der Nasenhöhle (Abbildung 11) - abzubilden. Ein weiteres wesentliches Ergebnis der Projektförderung ist die Etablierung eines neuromorphen Mapping-Verfahrens, das die Kartierung der Lokalisation von Hirnarealen anhand des Allen Mouse Brain Atlas (https://portal.brain-map.org/) erlaubt. Damit können die individuell unterschiedlichen Hirngewebe auf einen Referenzatlas kartiert werden. Dies stellt eine zwingende methodische Voraussetzung für die vergleichende Neuroanatomie im Projekt dar und konnte anhand eines Mausmodells etabliert werden, in dem Nervenzellen und deren Fasern, die durch Expression des Dopamin Typ 3 Rezeptors (D3R) charakterisiert sind, im Gehirn lokalisiert und verfolgt wurden (Abbildungen 12 & 13). Nach Kreuzung entsprechender D3R::Cre Treiberlinien mit Ai14 Reportermäusen und CLARITY-basierter Probenaufbereitung erlaubt die endogene Expression des Fluoreszenzproteins tdTomato die genaue Lokalisation und quantitative Bestimmung morphologisch-anatomischer Parameter, wie Zellzahl, Faserdichte, Projektionsgebiet, etc. Zusammengefasst stellen die im NeuroBox Projekt erzielten "Proof-of-Principle" Ergebnisse nun ein solides methodisches Fundament dar, um fortan den Einfluss von Abwasser-Neurotoxinen auf die Neuroanatomie des olfaktorischen Systems genau zu untersuchen.



Abbildung 10: CLARITY – Technologie, Workflow, Ergebnisse. (A) Lichtundurchlässigkeit ist das Ergebnis von Streuung und ungleichen Brechungsindizes. Die Kombination von elektrophoretischem Tissue-Clearing und Refractive Index Matching erzeugt "transparente" Gewebe. (Aii) zeigt den Schädel einer neonatalen Maus vor und nach CLARITY. (B) Schema der CLARITY-Methode; modifiziert nach (Chung and Deisseroth, 2013). Fixation mit Formaldehyd und Hydrogelmonomeren (i). Polymerisation der Monomere wird thermisch induziert (37°C), worauf sich ein Gewebe-Hydrogel Hybrid bildet (ii). Anlegen eines elektrischen Feldes in Detergenz-Lösung entfernt Membranlipide (iii). (C-E) Mikroskopie einer OMP-GFP Maus (Potter et al., 2001). In dieser Mauslinie exprimieren alle olfaktorischen Neuronen das grün fluoreszierende Protein (GFP). Nach Eingebetten in sog. Refractive Index Matching Lösung ($\eta = 1.47$) erlaubt ein Immersionsobjektiv mit weitem Arbeitsabstand und hoher numerischer Apertur die anatomische Beschreibung weiter Teile des olfaktorischen Systems. Deutlich zu erkennen sind dorsale Teile des Riechepithels (MOE) sowie Nervenfaserbündel die durch die Siebbeinplatte (cribriform plate (CP)) ziehen und in einer Vielzahl von Glomeruli im Außenbereich des olfaktorischen Bulbus (MOB) enden. (Stapeltiefe, 2,0 mm; Bildabstand, 10 µm). Skalierungsbalken in Einzelbilder (rechts), 75 µm.



Abbildung 11: CLARITY–Analyse des olfaktorischen Epithels. Nach CLARITY Behandlung erlaubt die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie eine relativ schnelle und dabei detailgetreue Rekonstruktion intakter Gewebe. (A–C) GFP Fluoreszenz olfaktorischer Neuronen (grün) und parallele Zellkernmarkierung (DRAQ5, rot). An der Grenze des sensorischen und respiratorischen Epithels gehen gelbe in rote Nuclei über (A, B). Axonbündel verlaufen unterhalb des Epithels. (B) Räumliche Darstellung zweier perpendikulärer optischer Schnitte. Skalierungsbalken (A), 75 μm; (B), 50 μm; (C), 25 μm



Abbildung 12: Fasern von Neuronen, die den Dopamin Typ 3 Rezeptor (D3R) exprimieren innervieren verschiedene Regionen des Mausgehirns. (A) D3R-positive Neuronen gekennzeichnet durch Koexpression des Fluoreszenzproteins tdTomato (nach Kreuzung entsprechender D3R::Cre Treiberlinien mit Ai14 Reportermäusen). Nach CLARITY-basierter Aufbereitung lassen sich die Neuronen im Gehirn strukturell kartieren. Dies geschieht durch ein im NeuroBox-Projekt entwickeltes "Mapping"-Verfahren, bei dem die 3D Rekonstruktion auf den Maus Hirnatlas (Allen Mouse Brain Atlas) anhand anatomischer "Landmarks" angeglichen wurde. Die olfaktorischen Tuberkel (OT) und die hippocampale Formation (HF) sind durch hellblaue Volumina gekennzeichnet. (B&D) 3D Maximalprojektion der in (A) dargestellten Regionen. (C) Hochauflösende Detaildarstellung der in (B) gekennzeichneten Region.



Abbildung 13: D3R-positive Nervenzellen im piriformen Kortex zeigen lediglich lokale Konnektivität. (A) D3R-positive Neuronen gekennzeichnet durch tdTomato Koexpression (D3R::Cre Treiberlinien X Ai14 Reportermäuse). Strukturelle Kartierung nach CLARITY-basierter Aufbereitung anhand des im NeuroBox-Projekt entwickelten "Mapping"-Verfahrens. Die olfaktorischen Tuberkel (OT) und die hippocampale Formation (HF) sind durch hellblaue Volumina gekennzeichnete. (B) Hochauflösende Detaildarstellungen der in (A) gekennzeichneten Region.

M7: Untersuchung von funktionalen Defiziten mit physiologischen Messmethoden und Vergleich der Veränderungen am visuellen oder olfaktorischen System von Mäusen mit Effekten im Fischmodell mit gleichzeitigem Abgleich von Ergebnissen von standarisierten in vitro Testverfahren

Für die Entwicklung spezifischer, neurotoxikologischer *in vitro* und *in vivo* Testverfahren in Mausmodellen und murinen bzw. humanen Zelllinien (z.B. HEK293T Zellen, Primärkulturen muriner testikulärer Zellen) wurde zunächst die notwendige apparative Infrastruktur für die Laserbasierte *in vitro* und *in vivo* Mikroskopie beschafft. Parallel dazu wurden die tierschutzrechtlich notwendigen Tierversuchsanträge gestellt und im vollen Umfang genehmigt.

Nach intensiver Literaturrecherche bezüglich relevanter Agonisten und Antagonisten von neuronal exprimierten Ionenkanälen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und G-Protein-vermittelten Signalkaskaden, wurde die Liste potentiell relevanter Target-Substanzen entsprechend erweitert. Gleichzeitig wurde ein Assay für die elektrophysiologische Testung entsprechender Targets an rekombinant exprimierten Ionenkanälen der HCN Kanalfamilie etabliert (Abbildung 14).



Abbildung 14: Funktionale Testfür strategie die Untersuchung neurotoxikologischer Effekte von Target-Substanzen auf Ionenkanäle der hyperpolarisationsaktivierten, zvklisch Nukleotid-gesteuerten (HCN) Kanalproteinfamilie. (A) Weitfeld-Abbildung Lichtmikroskopische von HEK293T Zellen im Differential-Interferenzkontrast bzw. bei Visualisierung transfizierter Zellen durch Epi-Fluoreszenz. (B) Voltage-Clamp Pulsprotokoll zur Aktivierung rekombinant exprimierter HCN Kanäle durch schrittweise Hyperpolarisierung Plasmamembran. der (C) Ableitung Charakteristische hyperpolarisationsaktivierter Ströme. (D, E) Strom-Spannungs-Kurve (D) beziehungsweise Aktivierungskurve (E) HCN2 Kanälen von unter Kontrollbedingungen.

Neben Expressionsassays für HCN2 (Abbildung 14) und HCN4 Kanalisoformen (hier aus Platzgründen nicht gezeigt), wurde ebenfalls versucht einen funktionalen Test anhand von HCN3 lonenkanälen zu etablieren. Hier ist es trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen, funktionale Expression in HEK293T Zellen nachzuweisen. Sowohl HCN2, als auch HCN4 lonenkanäle wurden in Ab- und Anwesenheit potenziell neurotoxischer Substanzen vergleichend untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Target-Substanzen im relevanten Dosis-Wirkungsbereich festgestellt werden.Heterologe Expression rekombinanter HCN2 und 4

Kanäle eignet sich daher nicht, um in standarisierten *in vitro* Testverfahren die Toxizität von im Abwasser gefundenen Molekülen zu analysieren. Für alle weiteren Testverfahren wurden daher neue ex vivo / in situ und in vivo Methoden etabliert.

Für die Etablierung eines Tests neurotoxischer Effekte auf spontane neuronale Netzwerkaktivität haben wir uns im Anschluss intensiv mit der Konfokal- beziehungsweise Multiphotonen-Mikroskopie für Ca²⁺ Bildgebung im Akzessorischen Olfaktorischen Bulbus (AOB) der Maus befasst. Dabei haben wir die Basis- / Spontanaktivität der im AOB lokalisierten Mitralzellen (schematisch in Abbildung 15 dargestellt) analysiert.



Abbildung 15: Darstellung (schematisch) der Anatomie und Netzwerkstruktur der unterschiedlichen exzitatorischen, wie der vielfältigen inhibitorischen Neuronentypen im AOB der Maus. Dargestellt sind die Mitralzellen in der oberen Mitralzellschicht (mitral cell layer), die GABAergen Körnerzellen (granule cells), die periglomerulären Zellen in der glomerulären Schicht (glomerular layer), die afferenten Nervenfasern der vomeronasalen sensorischen Neuronen (type A & B axons), der laterale olfaktorische Trakt (LOT) und die zur Amygdala (Mandelkern) und zum Hypothalamus projizierenden Axone der Mitralzellen.

Diese Zellen stellen die prinzipiellen Projektionsneuronen dieses Hirnareals und damit die erste Verarbeitungsebene sensorischer Information im akzessorischen olfaktorischen Schaltkreis dar. Die Spontanaktivität, d.h. die elektrische Entladungsaktivität unter Ruhebedingungen, haben wir unter sowohl Kontrollbedingungen als auch vergleichend während akuter Exposition mit verschiedenen putativ neurotoxischen Substanzen, die in Abwässern nachgewiesen wurden (Dichlorvos, Imidacloprid und TDCPP; jeweils 1 μ M), untersucht.



Abbildung 16: Unterschiedliche apoptotische bzw. nekrotische Wirkung der putativ verschiedenen neurotoxischen Substanzen auf Mitralzellen des AOB im Schnittpräparat. akuten Während Dichlorvos (1 µM) keinen Anstieg des neuronalen Zelltods akut induziert (3 min Inkubation), steigt unter Einfluss von sowohl

Imidacloprid, als auch TDCPP; je 1 µM) die neuronale Sterblichkeit akut an.

Neben standardisierten Zelltod-Assays (sog. Live / Dead Assays; Abbildung 16), die sowohl in Zellkultur, als auch in akuten AOB Schnittpräparaten durchgeführt wurden, haben wir zunächst eine Präparation des AOB etabliert, in der wir nun in der Lage sind, spontane Oszillationsmuster und deren potenzielle Veränderung durch die putativ neurotoxischen Substanzen zu untersuchen (Abbildung 17). Dabei wurde als Read-out der Nervenzellaktivität die Entladungsrate der Mitralzellen – gemessen mit genetisch kodierten Ca²⁺ Indikatoren (hier GCaMP6f) – sowohl durch Frequenz-, als auch durch Spektralanalysen etabliert. Ein wesentliches Arbeitspaket war hier naturgemäß die detaillierte Charakterisierung dieser Oszillationsmuster unter Kontrollbedingungen (Abbildung 17).



Abbildung 17: Analysemethode zur Untersuchung der spontanen Entladungsmuster in Mitralzellen des AOB im akuten Gewebeschnittpräparat. A) Darstellung eines 250 µm Akutschnitts des AOB der Maus, dargestellt im Differentialinterferenzkonstrast und anhand der Fluoreszenz von Mitralzellen in Tbet::Cre x Ai95D Mäusen. B) Variabilität der spontanen Aktivität einzelner Mitralzellen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des genetisch kodierten Ca2+ Indikators GCaMP6f über die Zeit. Während manche Mitrazellen zufällige Entladungsmuster zeigen

(rot), beobachtet man bei anderen Neuronen periodische Burst-Aktivität (blau). Andere Nervenzellen wiederum zeigen keine spontane Aktivität. Kurzzeitige Applikation einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration (50 mM) dient als Viabilitätskontrolle. C & D) Beschreibung der Aktivitätsmuster anhand von sowohl Frequenz-, als auch Spektralanalyse.
E) Heatmap der relativen Power-Spektren einzelner Mitralzellen zeigt die vorherrschende Präsenz sog. "infraslow" Oszillationen (Buzsáki and Draguhn, 2004; Crunelli et al., 2018). F) Kumulative Wahrscheinlichkeit (oben) und Anzahl distinkter Frequenz-Peaks im Power-Spektrum einzelner Mitralzellen.

In diesem Kontext gelang es uns erstmals eine Netzwerkanalyse einzelner Mikroschaltkreise im AOB durchzuführen und dies für spätere neurotoxische Substanzanalysen zu etablieren (Abbildung 18). Die Eignung dieses Analyseansatzes für neurotoxikologische Untersuchungen muss allerdings in weiteren systematischen Studien noch hinreichend bestätigt werden.



Abbildung 18: Netzwerkanalyse einzelner Mikroschaltkreise im AOB. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (oben, links) eines 250 µm Akutschnitts des AOB einer Tbet::Cre x Ai95D Maus. Hervorgehoben (rote Punkte) sind einzelne Mitralzellen die rhythmisch und synchron im Verbund (blaue Linien) oszillieren. die einzelnen analysierten Mikroschaltkreise sind zur besseren Übersicht ebenfalls topographisch dargestellt (oben, rechts). Die Originalmessungen der Fluoreszenzintensitäten der in den oberen zwei Kartierungen gezeigten Mitralzellen sind jeweils übereinandergelegt dargestellt (unten, links). Zudem wurde die Anzahl der AOB Mitralzellen (AMCs) pro Mikroschaltkreise und die Anzahl der Mikroschaltkreise pro Gewebeschnitt (unten, rechts) aufgetragen.

Nachdem die Etablierung des Präparats und die genaue Beschreibung der unter Kontrollbedingungen (Abbildung 19) vorherrschenden Nervenzellaktivitätsmuster gelungen war, konnten wir daraufhin in systematischen Experimenten einerseits substantielle Veränderungen der Aktivitätsmuster durch Dichlorvos (Reduzierung und Verlangsamung der Oszillationen; Abbildung 20), als auch durch Imidacloprid (Initiation zusätzlicher Oszillationen) beobachten.



Abbildung 19: Spontane Oszillationsmuster in Mitralzellen des AOB. Stimulationsparadigma mit zugehörigem Ca²⁺ Profil als Funktion der Zeit (oben). Quantifizierung der Häufigkeit oszillierender Neuronen sowie spektrales Dichtehistogramm als Frequenzfunktion und normierte Einzelzelldaten (unten).



Abbildung 20: Veränderungen der Aktivitätsmuster in AOB Mitralzellen durch Exposition mit Dichlorvos (1 μ M). Inkubation mit der putativ neurotoxischen Substanz führt zur Reduzierung der Oszillationsquantität sowie zu einer Verlangsamung der Oszillationen (Qualitätsänderung).

In einem weiteren Teilprojekt haben wir uns auf die Etablierung eines Testsystems für neurotoxische Schädigungen des peripheren Nervensystems fokussiert. Diese Arbeiten sind aufgrund der Problematik der Corona-Pandemie noch immer in einem vergleichsweise frühen Stadium und würden sich daher hervorragend für ein Anschlussprojekt eignen.

In diesem Teilprojekt haben wir erneut ein akutes Schnittpräparat etabliert, das sich für funktionale Analysen mit Hilfe der Fluorezenzmikroskopie (Ca²⁺ Imaging) eignet. Basierend auf unseren eigenen Vorarbeiten (Cichy et al., 2015), haben wir koronale Akutgewebeschnitte des

Vomeronasalorgans der Maus hergestellt und diese zunächst bezüglich ihrer Pheromonsensitivität getestet, um die Kontrollbedingungen für spätere Toxinexpositionsanalysen im Detail zu beschreiben (Abbildung 21).



Abbildung 21: Charakterisierung der vomeronasalen Pheromonsensitivität unter Kontrollbedingungen. A) Diagramm der Lokalisation des Vomeronasalorgans im Schädel der Maus. B) Darstellung eines 200 µm Akutschnitts des Vomeronasalorgans, dargestellt im Hellfeld (oben) und anhand der Fluoreszenz einzelner Neuronen nach Beladung mit dem synthetischen Ca2+-Reporterfarbstoff C) CAL520. Variabilität der sensorischen Áktivität einzelner VNO Neuronen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität Ca2+ des Indikators CAL520 über die Zeit. Die Stimulation erfolgt durch Exposition verdünntem gegenüber Mausurin (1:100). Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Signale wird durch den R-Index quantitativ beschrieben. Kurzzeitige Applikation einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration (50 mM) dient als Viabilitätskontrolle. D &E) Histogramme der jeweiligen R-Indices bei Analyse der Signalamplitude (D) oder des Integrals (E).

Abschließend ist es uns gelungen, die potenziellen Testverfahren für neurotoxische Substanzen aus Abwässern um einen neuartigen Stammzell- / Neurogenese-Assay zu erweitern. Durch Etablierung eines neuen genetisch modifizierten Mausmodells können wir nun die die axonale Wegfindung vomeronasaler Neuronen im Kontext adulter Neurogenese vergleichend, d.h. unter Kontrollbedingungen *versus* Schadstoffexposition, analysieren. Die Prinzipien der axonalen Wegfindung olfaktorischer Neuronen und deren konvergenter Projektion in spezifische Glomeruli waren und sind Gegenstand intensiver Forschung^{81–85} und kontroverser Diskussionen. Die im VNO implementierten Mechanismen sind weniger untersucht. Da auch im vomeronasalen



System lebenslang sensorische Neuronen durch adulte Neurogenese ersetzt werden⁸⁶, ist dieses ebenfalls geeignet, System um potentiellen Modellcharakter für Fragen des Einfluss von Umweltschadstoffen auf adulte Neurogenese, Differenzierung und axonale Wegfindung zu beantworten. Hier nutzen wir ein Mausmodell, bei dem die Expression von membranständigem GFP chemisch induzierbar in genau den Zellen erfolgt, die zum Zeitpunkt der Induktion Id2 (inhibitor of differentiation 2) exprimieren⁸⁷ (Abb. 22).

Abbildung 22. Untersuchung adulter vomeronasaler Id2-CreER^{T2} im Neurogenese Mausmodell. (A) Darstellung genetischen Schematische der Markierungsstrategie. Modifiziert nach 87. (**B**) Konfokale Maximalprojektion eines Bildstapels in der proliferativen Marginalzone eines adulten VNO (Kryoschnitt). Eine Reihe von GFP-positiven sensorischen Neuronen im Randbereich ist deutlich zu erkennen. Die GFP Fluoreszenz erlaubt ebenfalls die Visualisierung einzelner Axone. Skalierungsbalken, 50 µm.

Unsere präliminären Ergebnisse zeigen, dass in der proliferativen Randzone des adulten VNO neu generierte Neuronen markiert und mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden können (*Abb. 22*). Wir beabsichtigen nun, das "Schicksal" solcher Neuronen von der Genese bis zur intakten Projektion mit CLARITY–Lichtblattmikroskopie zu verfolgen und durch Umweltschadstoffe induzierte Veränderungen zu beschreiben.

Ein Vergleich zwischen den Aktivitätsmustern von Mitralzellen des Akzessorischen Olfaktorischen Bulbus (AOB) und den Ergebnissen, die *in vivo* in Zebrabärblingsembryo ermittelt wurden, ist aufgrund der Verschiedenheit der Testsysteme und Expositionsregime schwierig. Nichtsdestotrotz implizieren beide Ansätze einen adversen Effekt von Dichlorvos auf die neuronale Reizweiterleitung. So führte Dichlorvos etwa zu einer Reduktion und Verlangsamung der Oszillation in den Zellen des AOB. In 5 dpf Embryonen des Zebrabärblings resultierte Dichlorvos in eine Störung des visuellen Signalwahrnehmung und -weiterleitung. Weitere Substanzvergleiche sind zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht möglich, da es sich beim Mausmodell nicht um ein hochdurchsatz-fähiges Modell handelt. Die Untersuchung der generellen Übertragbarkeit zwischen dem Maus- und dem Zebrabärblingsmodell sollte daher weiterhin Bestandteil zukünftiger Forschungsanstrengungen sein.

Obwohl es eine große Anzahl von Verbindungen mit dem Potenzial für neurotoxische Wirkungen auf den Menschen gibt, mangelt es an Informationen über die Auswirkungen dieser Verbindungen auf die menschliche neuronale Entwicklung und Funktion. Derzeit basiert der Großteil der in wissenschaftlichen Studien berichteten Neurotoxizitätsdaten entweder auf in vivo Tiermodellen oder auf in vitro Modellen mit immortalisierten Zelllinien. Oftmals bereitet die Interpretation von experimentellen Daten, die aus in vivo Studien gewonnen wurden, aufgrund der Unterschiede zwischen den Spezies sowohl in der neuronalen Anatomie als auch in der Physiologie, Schwierigkeiten. Es besteht jedoch ein zunehmender Bedarf an alternativen spezies-spezifischen Toxikologie-Screening-Assays, die eine höhere Zuverlässigkeit und Effektivität zur Identifizierung und Charakterisierung des neurotoxischen Potenzials von Substanzen am Menschen aufweisen sollen. Die Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) und deren neuralen Derivaten zur Beurteilung der Neurotoxizität bietet viele Vorteile, wie z. B. die Möglichkeit der unbegrenzten Expansion sowie die Fähigkeit, nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Merkmale von Neuronen sowohl des ZNS als auch des PNS darzustellen. In diesem Sinne wurden in einer Kooperation mit der AG Lampert im Kontext einer gemeinsam betreuten Masterarbeit von Frau Sarah Gutierrez sensorische Neuronen (SNs), die von hiPSCs abgeleitet wurden, verwendet, um eine Screening-Plattform zu etablieren, die in der Lage ist, die Auswirkungen mehrerer Substanzen auf die Struktur und Funktion von menschlichen SNs zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zwei gängige Pyrethroid-basierte Insektizide (Deltamethrin und Bioallethrin) für die Entwicklung dieser Methodik ausgewählt. Um zwischen allgemeiner Zytotoxizität und spezifischer Neurotoxizität zu unterscheiden, wurden die no observed effect sub-cytotoxic concentrations (NOECs) von Deltamethrin und Bioallethrin mit Hilfe des Neutralrot-Uptake-Assays ermittelt. Die ausgewählten Testkonzentrationen wurden auf reife sensorische Neuronen appliziert. Nach der Exposition werden sowohl die Neuritenmorphologie als auch die Spontanaktivität beurteilt. Mittels Immunfärbung wurden die Neuriten und Zellkörper der Neuronen mit einem Imaging Reader quantifiziert. In Anbetracht der Tatsache, dass viele Störungen der neuronalen Erregbarkeit in Abwesenheit von morphologischen Veränderungen der Neuronen auftreten, gingen wir dazu über, Veränderungen der neuronalen Aktivität mit Hilfe der Multielektroden-Array (MEA)-Technologie zu bewerten. Somit haben wir hier eine humanbasierte Methode etabliert, die sowohl strukturelle als auch funktionelle Effekte potenzieller Neurotoxine umfasst. Ein Abgleich der Untersuchungen mit dem in vivo Modellen konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da die Methodik eine hohe Variabilität aufwies. Diese Variabilität konnte

nicht im Verlauf der Projektlaufzeit gelöst werden. Die Entwicklung dieses Modells wird jedoch unabhängig von NeuroBox Projekt fortgeführt, um ein *in vitro* Modell zu entwickeln, dass neurotoxischen Effekt auf sensorische Neuronen bewerten kann.

M8: Erstellung eines detaillierten Effektprofils von hormonstörenden Substanzen

Die potentielle Störung von Funktion und Entwicklung der Schilddrüse im Zebrabärblingsembryo wurde mittels qPCR untersucht. Hierfür wurden DEHP, MEHP, TDCPP und 4-NP, die als endokrin wirksame Substanzen bekannt sind, untersucht. Weiterhin wurden Gene der neuronalen Entwicklung analysiert, um eine gleichzeitige Beeinflussung von schilddrüsen- und neuronalen Markern untersuchen zu können (Tabelle 2 a,b). Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 als heatmap zusammengefasst. Insgesamt war die Zahl der signifikant regulierten Gene gering. Für 30 hpf Embryonen konnte ein signifikanter Einfluss von DEHP und 4-NP auf die Regulation von mbpb, während TDCPP die Zahl der hhex Transkripte reduzierte. Außerdem bewirkten TDCPP und 4-NP eine tendenzielle Reduktion von Schilddrüsen-relevanten tg Transkripten (Abbildung 24). Im Vergleich dazu wurde in 5 dpf Embryonen eine signifikante Zunahme der ttr Expression nach Exposition mit 4-NP festgestellt (Abbildung 25). Ein weiterer, signifikanter Einfluss auf eine Schilddrüsen-relevante Genregulation konnte nicht festgestellt werden, allerdings tendierten die Testsubstanzen dazu die Zahl an tshß und tg Transkripten zu beeinflussen (Abbildungen 10 und 11). In Bezug auf neuronale Marker konnte ein Effekt auf die Regulation von fosab gezeigt werden, welcher sich jedoch nur im Fall von DEHP als signifikant erwies (Abbildung 25). Für die weiteren untersuchten Transkripte konnte keine veränderte Regulierung, weder in 30 hpf noch in 5 dpf Embryonen, feststellen lassen.

Anhand dieser Ergebnisse war es möglich das thyroidstörende und neurotoxische Potential der endokrinen Disruptoren festzustellen. Allerdings sollten in Zukunft simultan die Effekte auf weitere, endokrine Systeme untersucht werden, da diese ebenfalls mit dem Nervensystem interagieren.

Tabelle 2a: Übersicht der selektierten Schilddrüsen-Markergene und ihre Funktion für die qPCR Analyse.

tg	Thyroglobulin
tpo	Thyroid peroxidase
traß	Thyroid receptor α
tsh-beta	Thyroid stimulating hormone
ttr	Transthyretin
dio1	Deiodinase 1
dio2	Deiodinase 2
hhex	Hematopoietically-expressed homeobox
nkx2	differentiation/growth of thyroid follicels

Tabelle 2b: Übersicht der selektierten neuronalen Markergene und ihre Funktion für die qPCR Analyse.bdnfbrain derived neurotrophic factor

fosab	Regultaion der Transkription am RNA-Polymerase II Promotor
mbpb	Myelin basic protein
chna1	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)
tuba1a	Essentieller Teil des Mikrotubulin-Zytoskeletts in sich entwicklenden Axonen und
	Dendriten
gabra1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
gfap	glial fibrillary acidic protein (gfap)
sertb	solute carrier family 6 member 4b, Serotonin Transporter
htr1aa	Serotonin 1A receptor
hsbp11	Heat shock protein



Abbildung 23: Die Heatmap zeigt die Expression der untersuchten Gene relativ zur Lösemittelkontrolle (0,01 % DMSO) und bezogen auf die house keeping Gene. Ergebnisse werden als log₂ Fold Change dargestellt. Eine fünftägige Exposition, d.h. 5 dpf Embryonen, sind durch eine "-5" hinter dem Substanznamen gekennzeichnet. 30 hpf Embryonen haben keinerlei zusätzliche Kennzeichnung. zfet = Negativkontrolle



Abbildung 24: Expressionsdaten: Auszug mittlere Expression von neurologisch- und schilddrüsenrelevanten Genen A) *mbpb*, B) *hhex* und C) *tg* 30 hpf Embryonen. Control= 0.01 % DMSO, zfet= negative control. *= p<0.05.



Abbildung 25: Expressionsdaten: Auszug mittlere Expression von neurologisch- und schilddrüsenrelevanten Genen A) *fosab*, B) *ttr*, C) *tshB* D) *tg* in 5 dpf Embryonen. Control= 0.01 % DMSO, zfet= negative control. *= p<0.05, **= p<0.01.

M9: Erstellung eines neurotoxischen Profils für hormonstörende Substanzen

Die Untersuchung verschiedener biologischer Ebenen in 5 dpf Zebrabärblingsembryonen zeigt, dass die gewählten, endokrinen Disruptoren das Schilddrüsen- sowie das Nervensystem beeinflussen können (Tabelle 3). Für die Exposition mit MEHP konnte dies sogar auf der Proteomebene bestätigt werden. Außerdem konnten Tendenzen hin zu einer erhöhten Schwimmaktivität dokumentiert werden. Zurzeit sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden, um eindeutige Schlussfolgerungen ziehen zu können. Sie zeigen jedoch, dass die Exposition gegnüber endokrin wirksame Stoffen Auswirkungen auf das sich entwickelnde Nervensystem und dessen Funktion haben kann.

Tabelle 3: Toxizitätsprofile von 2 μ M TDCPP, 10 μ M DEHP, 5 μ M MEHP und 2 μ M 4-NP anhand der durchgeführten Untersuchungen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen in 5 dpf Zebrabärblingsembryonen. Arrows indicate the direction of effect. *= p<0.05, **= p<0.01

Substanz	Genexpression	Neurotransmitter	Proteom	Verhalten
TDCPP	tshß ↑, fosab ↑	GABA ↑*		↑
DEHP	tshß ↑, fosab ↑*			↑
MEHP	<i>tshß</i> ↑, <i>fosab</i> ↑	GABA ↑*	Impairment of nervous system function (incl. sensory system) & cellular function	↑
4-NP	<i>tshß</i> ↑, <i>fosab</i> ↑, ttr ↑**	GABA ↑**		↑

Fazit

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten auf eine neurotoxische Wirkung der endokrin wirksamen Substanzen, auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation hin. So konnte z.B. ein Einfluss auf *fosab* detektiert werden, welches im Menschen mit neurologischen Effekten in Verbindung gebracht wurde. Weiterhin kam es zu einer Dysregulation des GABA-Neurotransmittersystem und einer veränderten Expression von schilddrüsenrelevanten Genen. Hierbei konnte jedoch nicht ermittelt werden, inwieweit die potentiell neurotoxischen Effekte durch eine Störung des Schilddrüsensystems oder eines anderen endokrinen Systems entstanden sind.

Außerdem war es nicht möglich die zeitliche Abfolge der Effekte zu ermitteln (zuerst endokrin oder zuerst neurotoxische Effekte). Dies sollte jedoch in zukünftigen Studien berücksichtigt werden, da sich so die Entstehung von DNT weiter aufklären ließe.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

NEUROBOX Verwendur 01.03.2017 - 31.12.2020	ngsnachweis 02	WRS1419C				
Pos.	Entstandene Ausgaben insgesamt bis einschl. 2020			Gesamtfinanzierungsplan		
	162420	163310	Σ	162420	163310	2
0812	342.575,17 €	118.888.96 €	461,464,13 €	320 036 00 €	122 324 00 €	442 360 00 6
0817			0.00 €		122.02.1,00 0	0.00 €
0820			0.00€		2011 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0,00 6
0822	1.432,74 €	1.340.69 €	2,773,43€	1.387.50 E	1 387 50 €	2 775 00 6
0831			0.00€		1.007,00 0	0.00 €
0834	Constant and the second s		0.00€			0,00 €
0835	56.461.02 €		56,461,02 €	59 429 00 E		50 420 00 6
0843	32.551,53 €	71.178.36 €	103,729,89 €	50 571 00 €	60 000 00 E	110 571 00 6
0846	11.591.59€	2.846.61 €	14 438 20 €	15 600 00 €	10 600 00 €	26 200 00 6
0850	49.766,28 €	24.997.56 €	74,763,84 €	50 000 00 €	25 000 00 €	75,000,00 €
Summe:	494.378,33 €	219.252,18 €	713.630.51 €	497.023.50 €	219.311.50 €	716 335 00 €

Wie in der Übersicht zu erkennen, waren die Personalkosten die wichtigste Position bei den angefallenen Kosten mit 461.464,13 €. Die etwas höheren Kosten gegenüber dem Gesamtfinanzierungsplan ergeben sich auch aus der kostenneutralen Verlängerung des Projektes. Bei den Investitionen war die Anschaffung eines Nikon-Fluoreszenzmikroskopes von großer Bedeutung. Weiterhin wurden relativ große Summen für verschiedene -omic-Untersuchungen verausgabt.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Obwohl im internationalen EU-Projekt SOLUTIONS gezeigt werden konnte, dass ca. 25 % der Wasserinhaltsstoffe eine potenziell neurotoxische oder neuroaktive Wirksamkeit besitzen, könnte innerhalb des Vorgängerprojektes ToxBox keine umfassende Bewertungsstrategie für die Bewertung von solchen Stoffen im Hinblick auf Trinkwasser und Oberflächenwasser ermittelt werden. Vor diesem Hintergrund wurde der BMBF-Verbund Neurobox durchgeführt. Im entsprechenden Bericht der Projektkoordination ist die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit umfassend dargestellt und erläutert. Im Kontext dieses Teilprojektes war u.a. das Prozessverständnis und das Verlinken von Verhaltenseffekten (die zu den bereits sehr gut standardisierten und validierten Testsystemen im Bereich der Neuroaktivität und -toxizität zählen) mit den zugrunde liegenden molekularen Effekten von größter Bedeutung. Weiterhin hat dieses Teilprojekt nicht genehmigungspflichtige Versuche mit frühen Lebensstadien von Zebrabärblingen als einem tierversuchsfreien Vertebraten-basierten Testsystem mit dem Mausmodell und humanen Gesichtspunkten verknüpft. In diesen Bereichen besteht ein großer Forschungs- und Regulierungsbedarf. Für solche Untersuchungen sind im Rahmen der regulären

Bewirtschaftung der Universitäten keine finanziellen Mittel vorhanden, so dass eine entsprechende Projektförderung sehr wichtig und angemessen war.

Für die Integration des Endpunktes "neurotoxische Effekte" in das GOW-Konzept und dementsprechend für die Aufnahme in den Leitfaden zur Bewertung von Spurenstoffen im Trinkwasser war es angemessen und notwendig die Untersuchungsstrategie in mehreren Stufen zu planen und durchzuführen. Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte aus einer Liste mit Trinkwasser relevanten Stoffen, die in einer gemeinsam im Verbundprojekt durchgeführten Literaturrecherche ausgewählt wurden. Unser Teilprojekt wählte aus dieser Liste Substanzen aus, die nach zwei Merkmalen definiert wurden. Zum einen wollten wir Stoffe testen, die sich aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit unterscheiden, also von sehr gut wasserlöslichen (z.B. Chlorpyrifos log KOW 0,57) bis hin zu sehr schwer wasserlöslichen Substanzen (z.B. MEHP log KOW 7,6). Des Weiteren wurden Substanzen ausgesucht, die nach einer QSAR-Analyse neurotoxische Effekte erwarten ließen und auch einem speziellen neurotoxischen Wirkmechanismus wie z.B. Acetylcholinesterase Inhibitoren. Aufgrund der Wirkweisen der neurotoxischen Substanzen wurden der Fischembryotoxizitätstest angepasst und darin unterschiedliche Methoden zur Untersuchung des Verhaltens implementiert. Ergänzt wurde das Testdesign durch Omics-Verfahren wie Proteomics, Metabolomics und Next-Generation-Sequenzierung. Unsere Studien konnten zeigen, dass ein Screening-Verfahren etabliert werden kann, bei dem unterschiedliche Endpunkte im Rahmen der Embryonalentwicklung der Zebrafische mit den gleichen Organismen untersucht werden können. Das integrierte Testdesign stellt also eine gute Möglichkeit für ein schnelles, sensitives und effizientes Screening innerhalb einer Testbatterie dar, während besonders die Proteomics-Analyse Effekte auf Proteinebene ergänzt. Die gezeigten Ergebnisse bestätigen die Auswahl der Testsubstanzen und die Durchführung in den gewählten Testsystemen. Basierend auf den Befunden konnte z.B. auch ein internationaler Ringtest innerhalb des NORMAN-Netzwerkes durchgeführt werden. Basierend auf den Befunden soll die Kombination aus Danio rerio-basierten Untersuchungen in den Leitfaden integriert werden. Während verhaltensbasierte Untersuchungen für ein Routine-Screening angeraten werden können, sind die -omics Untersuchungen und die Mausuntersuchungen im Sinne eines gestuften Vorgehens bei immer komplexeren Fragestellungen einzusetzen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Entwicklung einer hierarchischen Testbatterie zur Risikobewertung von anthropogenen (neurotoxischen und endokrinen) Spurenstoffen im Trinkwasser wird durch die in Teilprojekt 3 geleistete Arbeit sinnvoll und umfassend ergänzt. Neurotoxische Effekte sind im GOW-Konzept bisher nicht als Endpunkt aufgenommen, obwohl dies zur ganzheitlichen Risikobewertung und einem anschließenden Risikomanagement eine unabdingbare Voraussetzung sein sollte. Auf regulatorischer Ebene z.B. der EU besteht das Bestreben neurotoxische Effekte und Effekte auf die neuronale Entwicklung zu bewerten (vgl. Legradi et al. 2018, Ford et al 2021). Auf Ebene des Bundes und der Länder sind bisher keine gesetzlich vorgeschriebenen Entscheidungskriterien in Bezug auf neurotoxische Substanzen festgelegt worden. Somit kann die Implementierung des

Endpunktes "neurotoxische Effekte" in das GOW-Konzept und den Leitfaden zur Risikobewertung von Spurenstoffen in Trinkwasser einen wichtigen Beitrag zur aktuellen Diskussion und Entscheidungsfindung darstellen. Zudem können Fachbehörden und Wasserversorger auf dieser vereinheitlichten, anwendungsbezogenen Grundlage eindeutige, nachvollziehbare und wissenschaftlich fundierte Methoden für ihr Risikomanagement einsetzen. Die Durchführung wird zudem langfristig finanziell besser planbar und kann durch die realistischen Expositions- und Wirkdaten einer unkoordinierten Überregulation entgegenwirken. Zweifelsohne müssen die neurotoxischen und endokrinen Wirkungen unbedingt in der Trinkwasserbewertung basierend auf einer fundierten wissenschaftlichen Betrachtung bewertet werden. Hier hat der Neurobox-Verbund große Fortschritte gebracht. Die zusammenfassenden Aspekte sind im Bericht der Projektkoordination dargestellt. Im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans konnten sehr wichtige Beiträge und eine insgesamt gute Verlinkung des Verhaltens als Endpunkt mit den entsprechenden molekularen Endpunkten erreicht und auch entsprechend publiziert werden. Zwei Dissertationen sind in der Abschlußphase und weitere internationale Publikationen sind in der Vorbereitung. Im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans wird die hier entwickelte Methodik innerhalb des NORMAN-Netzwerkes bereits weiter entwickelt für den Einsatz in der Effekt-dirigierten Analytik (EDA, Brack et al. 2017, 2018). So untersucht derzeit eine Masterarbeit in der Abteilung Hollert die Möglichkeit, verschiedene (verhaltensbasierte) Endpunkte an frühen Stadien Danio rerio für die Identifizierung der Treiber der Toxizität weiterzuentwickeln. Hier sehen wir (und auch die uns bekannten Wasserversorger) ein sehr hohes Potenzial, da durch die EDA potenziell gefährliche neurotoxisches Stoffe chemisch identifiziert und ggf besser eliminiert werden können. Im Kontext der OECD findet derzeit eine Ringtestung statt, in der auch das Wissen des Teilprojektes eingehen konnte und bei dem Frau Dr. Legradi als offizielle Teilnehmerin agiert. Insbesondere war die Verlinkung des Fisch- und des Mausmodelles angeht, besteht uE noch ein großer Forschungsbedarf.

Fazit des Teilprojektes 3. Innerhalb des Teilprojekts 3 wurden die Substanzeffekte auf verschiedenen biologischen Ebenen und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten im Zebrabärblingsembryo (*Danio rerio*) analysiert. Diese Ebenen reichten von molekularen Untersuchungen (Transkriptom, Proteom und Teile des Metaboloms) hin zu Verhaltenstests. Auf den molekularen Ebenen konnten zahlreiche Effekte detektiert werden. Hierbei zeigte sich, dass vor allem die Proteom- und Metabolomanlysen, gut für die Detektion von Entwicklungsneurotoxizität geeignet sind. Im Hinblick auf Schnelligkeit und Effizienz eigneten sich vor allem die Neurotransmittermessungen für eine Abschätzung des neurotoxischen Potentials der Testsubstanzen. Diese konnten im Zusammenhang mit qRT-PCR die schilddrüsenstörende Wirkung der endokrin wirksamen Substanzen feststellen, sowie deren Einfluss auf Komponenten der neuronalen Entwicklung. Anhand dieser Analysen konnte ein erster Entwurf eines neurotoxischen Profils dieser Substanzen generiert werden. Dieses sollte jedoch durch weiterführende Untersuchungen verifiziert werden. Da es nicht möglich war mittels molekularer Methoden übereinstimmende Biomarker zu identifizieren wird vorgeschlagen pathway-basierte Schwellenwerte und Bewertungsansätze im Rahmen des GOW zu verfolgen.

Um die Relevanz von substanzinduzierten, molekularen Veränderungen auf höhere Organisationsebenen zu untersuchen, wurden zudem Verhaltenstests mit den embryonalen Entwicklungsstadien von *D. rerio* durchgeführt. Eine detaillierte Betrachtung des Verhaltens von
fünf Tage alten Embryonen im Hell/Dunkel-Transition Test ermöglichte eine neue und differenzierte Möglichkeit den Einfluss von Chemikalien auf das Motoneuronensystem zu bewerten. Weiterhin wurde eine Testbatterie von Verhaltenstests generiert. Diese nutzte das zeitlich bedingte Auftreten bestimmter Verhaltensweisen während der Embryonalentwicklung, welche charakteristisch für bestimmte Schritte in der Nervensystementwicklung sind. Durch diesen Ansatz war es möglich dieselben Embryonen für eine Vielzahl von Experimenten zu nutzen. Hierdurch konnte die Zahl insgesamt benötigter Testorganismen reduziert sowie der Einfluss einer Chemikalie auf verschiedene Verhaltensaspekte während der neuronalen Entwicklung beobachtet werden. Insgesamt führte dies zu einer effizienteren Abschätzung des neurotoxischen Potentials einzelner Substanzen.

Die vorgeschlagenen Methoden und Test liefern einen umfassenden Einblick in substanzbedingte Entwicklungsneurotoxizität. Im Hinblick auf ihre Verwendung zeichneten sich vor allem die Verhaltenstest mit D. rerio Embryonen durch ihre einfache und schnelle Umsetzung aus. Auch die Nutzung von qRT-PCR kann als effiziente Methode betrachtet werden, wohingegen Transkriptom-, Proteom- oder Metabolomanalysen ein gewisses Maß an Expertise erfordern. Daher wird für die Verwendung in Bezug auf das GOW-Konzept folgendes Vorgehen als Teststrategie vorgeschlagen: Zunächst wird die Substanz oder Probe mittels der Batterie aus Verhaltenstests gescreent. Im Falle signifikanter Veränderungen in einem der Tests findet eine GOW-Bewertung statt. Sind weitere Untersuchungen notwendig, wird der Einsatz molekularer Methoden empfohlen. Basierend auf den durchgeführten Experimenten wird zunächst die Nutzung von Neurotransmittermessungen vorgeschlagen, gefolgt von ggf. Proteom- und/oder Transkriptomanalysen (mRNA-Sequenzierunug oder qRT-PCR). Allerdings wurde dieser Ansatz bisher nicht auf komplexe Umweltproben wie Grundwasser angewendet. Die zusätzlich an Mäusen erzielten "Proof-of-Principle" Ergebnisse der Arbeitspakete 6 & 7 stellen ein solides methodisches Fundament dar, um fortan den Einfluss von Abwasser-Neurotoxinen auf die Neuroanatomie des olfaktorischen Systems in Mäusen genau zu untersuchen.

Im Rahmen der Arbeiten zu Teilprojekt 3 konnte gegenüber dem Vorläuferprojekt ToxBox eine **deutlich erweiterte Testbatterie für den Nachweis neurotoxischer Effekte bereitgestellt** werden, die nun auch **verschiedene Verhaltenstests** und -**multiOMIC-Untersuchungen** umfasst und über den Proof-of-concept auch die prinzipielle Eignung der **Integration des olfaktorischen Systems in Mäusen** aufzeigt. Durch die Integration dieser zusätzlichen Endpunkte in die Testbatterie erweitert sich die Aussagekraft und die Prädiktion der Testbatterie für die Ermittlung neurotoxischer Wirkungen von Trinkwasser.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nach unserem Wissensstand ist das Neuro-Box Projekt auf dem Gebiet der Entwicklung einer umfassenden, hierarchischen Teststrategie zur Risikobewertung von anthropogenen Spurenstoffen im Trinkwasser europa- und weltweit ein Vorreiter. Gerade durch Einbindung des GOW Konzeptes als Vorsorgewert für die menschliche Gesundheit mit drei wichtigen, relevanten Endpunkten (Gen- und Neurotoxizität sowie Endokrine Effekte) ist dies der führende und

verlässlichste Ansatz. Henner Hollert ist im Advisory Board eines internationalen Projektes der Global Water Research Coalition (GWRC), bei dem in einem internationalen Ansatz Effektbasierte Methoden in die Trinkwasserbewertung eingebracht werden sollen, ebenso hat er Projektzeitraum an dem EBM-Report für die Europäische Kommission mitgearbeitet, der einen Vorschlag für EBMs für die Revision der EU-WRRL erarbeitet und den europäischen Wasserdirektoren vorgestellt hat. In diesem Kontext konnte der Fortschritt aus Neurobox gut in aktuelle Prozesse integriert werden. Folge neue Aspekte haben sich hinsichtlich des Standes des Wissens ergeben:

Der Fischembryotoxizitätstest wurde im Kontext des Projektes nach OECD TG 236 durchgeführt und um entwicklungs- und verhaltensbasierte Endpunkte wie auch um anschließende omics-Analysen erweitert. Im Verlauf des Forschungsvorhabens wurden (von unseren Projektpartnern) in Bezug auf verhaltensbasierte Endpunkte spezifische Arbeiten zur Spontanbewegung von Zebrabärblingsembryonen veröffentlicht (Ogungbemi et al., 2020/2021, Zindler et al., 2019 a/b). Diese befassten sich mit einer erweiterten Durchführung des Tests zur Spontanbewegung (Zindler et al., 2019 a/b) sowie einer Verbesserung der Analyse und somit des zu entnehmenden Informationsgehaltes (Ogungbemi et al., 2020/2021). Weiterhin wurden mehrere Publikationen veröffentlicht, die sich mit der Verhaltensanalyse von weiter entwickelten Embryonalstadien (5 dpf) befassten. So wurden beispielsweise komplexe statistische Methoden erarbeitet und weiterentwickelt die eine genauere Beschreibung von Verhalten ermöglichen sollen (Hsieh et al., 2019, Leuthold et al., 2019, Liu et al., 2017). In Bezug auf die Darstellung von Ergebnissen des Licht-/Dunkel-Transitions Tests diente eine Publikation von Steele et al. (2018) als Inspiration und wurde in einer Publikation weiterentwickelt (Haigis et al., 2021 submitted). Für ein vertieftes Verständnis mechanistischer Grundlagen der Verhaltensreaktion sorgte die Publikation von Berg et al. (2018), sowie von Fitzgerald et al. (2019) welche sich mit der Variabilität des Verhaltens von Zebrabärblingsembryonen befasste.

In Bezug auf Fortschritte im Bereich von -omics wurden mehrere Studien publiziert, die sich ebenfalls mit einem mehrstufigen Ansatz befassten (Gómez-Canela et al., (2017), Ortiz-Villanueva et al., (2018), Piña et al., 2019, Raldúa et al. 2020, Reinwald et al., 2021, Blanc et al. 2021). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde beispielsweise der Effekt von Chlorpyrifosoxon auf verschiedene molekulare Ebene des Zebrabärblings untersucht. Hierbei konnten adverse Effekte der Substanz auf Prozesse des Endoplasmatischen Retikulums festgestellt werden (Piña et al., 2019). In Bezug auf endokrin wirksame Substanzen konnten wir kürzlich als Mitautoren von Reinwald et al. (2021), unter Anwendung verschiedener omics-Methoden, einen AOP für Schilddrüseneffekte erarbeiten. Außerdem ermöglichen Fortschritte im Bereich der Lipidomanalysen von Zebrabärblingen neue Untersuchungsmöglichkeiten wie etwa Blanc et al. (2021) oder Marqueño et al. (2019) demonstrierten. Diesbezüglich prägte die Publikation von Dreier und Kollegen (2021) bereits den Begriff "Ecotoxico-lipidomics". Aktuell gibt es im Bereich Lipidomanalysen auch Fortschritte bei Embryoanalysen (Xu et al., 2020), sodass diese in zukünftige omic-Ansätze integriert werden können.

Als Metapublikationen sind einerseits ein Review von Legradi et al. (2018) zu nennen, zu dem wir zahlreich Mitglieder des Neurobox-Konsortiums und führende Kolleg*innen des US EPA, dem

niederländischen KWR und des Umweltbundesamtes gewinnen konnten. Neben dem Schutzziel "menschliche Gesundheit" ist auch "ecosystem health" von Bedeutung und hier speziell die Eco-Neurotoxizität: Trotz aller Anstrengungen, die in den letzten Jahren in die Entwicklung neuartiger In-vitro- oder In-silico-Testsysteme investiert wurden, sind In-vivo-Tests mit Nagetieren immer noch der einzige akzeptierte Test für die Risikobewertung der Neurotoxizität in Europa. Trotz einer zunehmenden Anzahl von Berichten über Arten, die ein verändertes Verhalten zeigen, ist eine Neurotoxizitätsbewertung für Arten in der Umwelt nicht erforderlich und wird daher meist nicht durchgeführt. In Anbetracht der steigenden Anzahl von Umweltkontaminanten mit potenziell neurotoxischem Potenzial sollte auch die Öko-Neurotoxizität in der Risikobewertung berücksichtigt werden. Um die Bewertung der Ökoneurotoxizität in die europäische Risikobewertung zu implementieren, könnten als erster Ansatz zur Identifizierung ökoneurotoxischer Schadstoffe die Cheminformatik und In-vitro-Screening-Tests verwendet werden. In einem zweiten Schritt könnte eine kleine Spezies-Testbatterie angewendet werden, um die Risiken für Ökosysteme zu bewerten. Basierend auf einem internationalen UBA Workshop 2019 zum Thema "The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection" wurde kürzlich ein entsprechender Review in ES&T unter unserer Mitautorenschaft von Ford et al. (2021) publiziert, bei dem ebenfalls die Erfahrungen aus Neurobox eingebracht werden konnten und der aktuelle Stand des Wissens (s.o.) zusammengefasst ist.

multiOMICs

- Blanc, M., Alfonso, S., Bégout, M. L., Barrachina, C., Hyötyläinen, T., Keiter, S. H., & Cousin, X. (2021). An environmentally relevant mixture of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenylethers (PBDEs) disrupts mitochondrial function, lipid metabolism and neurotransmission in the brain of exposed zebrafish and their unexposed F2 offspring. *Science of the Total Environment*, *754*, 142097. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142097</u>
- Dreier, D. A., Bowden, J. A., Aristizabal-Henao, J. J., Denslow, N. D., & Martyniuk, C. J. (2020). Ecotoxico-lipidomics: An emerging concept to understand chemical-metabolic relationships in comparative fish models. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36(September), 100742. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100742
- Gómez-Canela, C., Prats, E., Piña, B., & Tauler, R. (2017). Assessment of chlorpyrifos toxic effects in zebrafish (Danio rerio) metabolism. *Environmental Pollution*, *220*, 1231–1243. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.010
- Marqueño, A., Blanco, M., Maceda-Veiga, A., & Porte, C. (2019). Skeletal Muscle Lipidomics as a New Tool to Determine Altered Lipid Homeostasis in Fish Exposed to Urban and Industrial Wastewaters. *Environmental Science and Technology*, *53*(14), 8416–8425. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02064</u>
- Ortiz-Villanueva, E., Jaumot, J., Martínez, R., Navarro-Martín, L., Piña, B., & Tauler, R. (2018). Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (Danio rerio) embryos

by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. *Science of the Total Environment*, *635*, 156–166. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.369

- Piña, B., Ziv, T., Faria, M., Ben-Lulu, S., Prats, E., Arick, M. A., Gomez-Canela, C., Garcia-Reyero, N., Admon, A., & Raldua, D. (2019). Multiomic analysis of zebrafish models of acute organophosphorus poisoning with different severity. *Toxicological Sciences*, *171*(1), 211–220. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz133
- Raldúa, D., Casado, M., Prats, E., Faria, M., Puig-Castellví, F., Pérez, Y., Alfonso, I., Hsu, C. Y., Arick, M. A., Garcia-Reyero, N., Ziv, T., Ben-Lulu, S., Admon, A., & Piña, B. (2020). Targeting redox metabolism: the perfect storm induced by acrylamide poisoning in the brain. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57142-y
- Reinwald, H., König, A., Ayobahan, S. U., Alvincz, J., Sipos, L., Göckener, B., Böhle, G., Shomroni, O., Hollert, H., Salinas, G., Schäfers, C., Eilebrecht, E., & Eilebrecht, S. (2021). Toxicogenomic fin(ger)prints for thyroid disruption AOP refinement and biomarker identification in zebrafish embryos. *Science of the Total Environment*, 760. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143914</u>
- Xu, H., Jiang, Y., Li, S., Xie, L., Tao, Y. X., & Li, Y. (2020). Zebrafish oxr1a knockout reveals its role in regulating antioxidant defenses and aging. *Genes*, 11(10), 1–22. https://doi.org/10.3390/genes11101118

Verhalten

- Berg, E. M., Björnfors, E. R., Pallucchi, I., Picton, L. D., & El Manira, A. (2018). Principles Governing Locomotion in Vertebrates: Lessons From Zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 12(September), 1–18. <u>https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00073</u>
- Dach, K., Yaghoobi, B., Schmuck, M. R., Carty, D. R., Morales, K. M., & Lein, P. J. (2019). Teratological and behavioral screening of the national toxicology program 91compound library in Zebrafish (Danio rerio). *Toxicological Sciences*, *167*(1), 269–281. <u>https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy266</u>
- J. B. Legradi, C. Di Paolo, M. H. S. Kraak, H. G. van der Geest, E. L. Schymanski, A. J. Williams, M. M. L. Dingemans, R. Massei, W. Brack, X. Cousin, M.-L. Begout, R. van der Oost, A. Carion, V. Suarez-Ulloa, F. Silvestre, B. I. Escher, 14, M. Engwall, G. Nilén, S. H. Keiter, D. Pollet, P. Waldmann, C., Kienle, I. Werner, A.-C. Haigis, D. Knapen, L. Vergauwen, M. Spehr, W. Schulz, W. Busch, D. Leuthold, S. Scholz, C. M. vom Berg, N. Basu, C. A. Murphy, A. Lampert, J. Kuckelkorn, T. Grummt and H. Hollert (2018): An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. Environmental Science Europe, 10.1186/s12302-018-0173-x
- Fitzgerald, J. A., Kirla, K. T., Zinner, C. P., & vom Berg, C. M. (2019). Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-019-49614-y</u>

- Fitzgerald, J. A., Könemann, S., Krümpelmann, L., Županič, A., & Berg, C. (2021). Approaches to Test the Neurotoxicity of Environmental Contaminants in the Zebrafish Model: From Behavior to Molecular Mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry, november 2020*, 0–2. <u>https://doi.org/10.1002/etc.4951</u>
- Hsieh, J. H., Ryan, K., Sedykh, A., Lin, J. A., Shapiro, A. J., Parham, F., & Behl, M. (2019). Application of benchmark concentration (BMC) analysis on zebrafish data: A new perspective for quantifying toxicity in alternative animal models. *Toxicological Sciences*, 167(1), 282–292. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy258
- Leuthold, D., Klüver, N., Altenburger, R., & Busch, W. (2019). Can Environmentally Relevant Neuroactive Chemicals Specifically Be Detected with the Locomotor Response Test in Zebrafish Embryos? *Environmental Science and Technology*, *53*(1), 482–493. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04327</u>
- Liu, Y., Ma, P., Cassidy, P. A., Carmer, R., Zhang, G., Brown, S. A., Pang, C. P., Zhong, W., Zhang, M., & Fai, Y. (2017). Statistical Analysis of Zebrafish Locomotor Behaviour by Generalized Linear Mixed Models. *Scientific Reports, January*, 1–9. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-017-02822-w</u>
- Ford, Alex T., Marlene Ågerstrand, Bryan W. Brooks, Joel Allen, Michael G. Bertram, Tomas Brodin, ZhiChao Dang, Sabine Duquesne, René Sahm, Frauke Hoffmann, Henner Hollert, Stefanie Jacob, Nils Klüver, James M. Lazorchak, Mariana Ledesma, Steven D. Melvin, Silvia Mohr, Stephanie Padilla, Gregory G. Pyle, Stefan Scholz, Minna Saaristo, Els Smit, Jeffery A. Steevens, Sanne van den Berg, Werner Kloas, Bob B. M. Wong, Michael Ziegler, and Gerd Maack. 2021. 'The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection', Environmental Science & Technology, 55: 5620-28.
- Ogungbemi, A. O., Teixido, E., Massei, R., Scholz, S., & Küster, E. (2020). Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®. *Neurotoxicology and Teratology*, *81*(July). https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106918
- Ogungbemi, A. O., Teixido, E., Massei, R., Scholz, S., & Küster, E. (2021). Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior endpoint using a workflow in KNIME. *MethodsX*, *8*, 101330. https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101330
- Steele, W. B., Kristofco, L. A., Corrales, J., Saari, G. N., Haddad, S. P., Gallagher, E. P., Kavanagh, T. J., Kostal, J., Zimmerman, J. B., Voutchkova-Kostal, A., Anastas, P., & Brooks, B. W. (2018). Comparative behavioral toxicology with two common larval fish models: Exploring relationships among modes of action and locomotor responses. *Science of the Total Environment*, 640–641, 1587–1600. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.402

- Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., & Braunbeck, T. (2019). Analysis of tail coiling activity of zebrafish (Danio rerio) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186(October). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109754
- Zindler, Florian, Beedgen, F., & Braunbeck, T. (2019). Time-course of coiling activity in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) – Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere*, 235, 12–20. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.154</u>

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6

Publikationen (erschienen, eingereicht oder in Planung)

A.C. Haigis, R. Ottermanns, A. Schiwy, H. Hollert, J. Legradi (2021): *Getting more out of the zebrafish light dark transition test.* Submitted for publication in Chemosphere.

A.C. Haigis, A. Schiwy, H. Hollert, J. Legradi (2021):*Multi-level behaviour screening- a novel approach for* (*substance induced*) *developmental neurotoxicity testing in zebrafish (Danio rerio) embryo.* In preparation for submission in ALTEX.

A.C. Haigis, P. Leonards, A. Schiwy, H. Hollert, J. Legradi (2021): *The future of DNT screening-Novel screening tools for DNT assessment using zebrafish (Danio rerio) embryos.* In preparation for submission in a peer-review journal.

A.C. Haigis, C. Preisinger, P. Leonards, L. Gan, A. Schiwy, J. Legradi, H. Hollert (2021): *The applicability of a multiOMICs approach in zebrafish (Danio rerio) embryos to elucidate the mechanisms underlying DNT*. In preparation for submission in a peer-review journal.

A.C. Haigis, C. Preisinger, P. Leonards, L. Gan, M. Spehr, A. Schiwy, J. Legradi, H. Hollert (2021):*Linking multiple levels of organisation – from OMIC's to behaviour*. In preparation for submission in a peer-review journal.

L. Guzman, G. Besa, D. Linares, L. González, C. Pont, M. Bartolini, A.C. Haigis, J. Legradi, D. Muñoz-Torrero, J. G.-C. M. Barenys (2020): *Evaluation of the effects of acetylcholinesterase inhibitors in the zebrafish touch-evoked response: quantitative vs. qualitative assessment.* Environmental Science Europe, 10.1186/s12302-020-00421-7

M. Gundlach, M. Augustin, K.E.C. Smith, D. Kämpfer, M. Paulzen,, H. Hollert. 2021. 'Effects of the antidepressant mirtazapine on the swimming behaviour and gene expression rate of Danio rerio embryos – Is the sedating effect seen in humans also evident for fish?', Science of the Total Environment, 792: 148368.

Ford, Alex T., Marlene Ågerstrand, Bryan W. Brooks, Joel Allen, Michael G. Bertram, Tomas Brodin, ZhiChao Dang, Sabine Duquesne, René Sahm, Frauke Hoffmann, Henner Hollert, Stefanie Jacob, Nils Klüver, James M. Lazorchak, Mariana Ledesma, Steven D. Melvin, Silvia Mohr, Stephanie Padilla, Gregory G. Pyle, Stefan Scholz, Minna Saaristo, Els Smit, Jeffery A. Steevens, Sanne van den Berg, Werner Kloas,

Bob B. M. Wong, Michael Ziegler, and Gerd Maack. 2021. 'The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection', Environmental Science & Technology, 55: 5620-28.

J. B. Legradi, C. Di Paolo, M. H. S. Kraak, H. G. van der Geest, E. L. Schymanski, A. J. Williams, M. M. L. Dingemans, R. Massei, W. Brack, X. Cousin, M.-L. Begout, R. van der Oost, A. Carion, V. Suarez-Ulloa, F. Silvestre, B. I. Escher, 14, M. Engwall, G. Nilén, S. H. Keiter, D. Pollet, P. Waldmann, C., Kienle, I. Werner, A.-C. Haigis, D. Knapen, L. Vergauwen, M. Spehr, W. Schulz, W. Busch, D. Leuthold, S. Scholz, C. M. vom Berg, N. Basu, C. A. Murphy, A. Lampert, J. Kuckelkorn, T. Grummt and H. Hollert (2018): *An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment*. Environmental Science Europe, 10.1186/s12302-018-0173-x

K. Spaan, A. C. Haigis, J. Weiss, and J. Legradi, "Effects of 25 thyroid hormone disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers," *Science of the Total Environment*, vol. 656. pp. 1238–1249, 2019., 10.1016/j.scitotenv.2018.11.071

Massei, Riccardo, Henner Hollert, Martin Krauss, Wolf von Tümpling, Cindy Weidauer, Peter Haglund, Eberhard Küster, Christine Gallampois, Mats Tysklind, and Werner Brack. 2019. 'Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with Zebrafish embryos', Environmental Sciences Europe, 31: 8.

Gundlach, M., Augustin, M., Finckh, S., Krauss, M., Roß-Nickoll, M., Brack, W., Linnemann, V., Paulzen, M., Hollert, H. (2021) Exposition of Danio rerio embryos to a neuroactive wastewater sample – Influence on behaviour and gene expression rate. To be submitted.

Gundlach, M., Augustin, M., Paulzen, M., Hollert, H. (2021). Effects of artificially produced mixtures of psychotropic drugs on the swimming behaviour and gene expression rate of zebrafish embryos. To be submitted. .

S. Malinowski, AC Haigis, A Schiwy, J. Legradi, H. Hollert & M. Spehr (2021): Proof of concept - investigation of neurotoxic substances using a mouse model. Comparison of changes in the visual or olfactory system of mice with effects in the fish model. To be submitted.

Abschlussarbeiten

Investigating neurotoxicity of insecticides on early life-stage zebrafish using high-throughput methods (MSc-Arbeit Jonas Nelles)

Establishing a neurotoxicological assay using human induced pluripotent stem cell derived sensory neurons (MSc-Arbeit Sarah Gutierrez)

Vorträge

Combination of six different zebrafish embryo behaviour assays for neurotoxicity screening. Ann-Cathrin Haigis, Andreas Schiwy, Jessica Legradi& Henner Hollert, Fish and Frog 2018.

Haigis A-C., Schiwy A., Legradi J., Hollert H., Combination of six different zebrafish embryo behavior assays for neurotoxicity screening, SETAC 2019, Helsinki, Finland

Neurotoxicity profiling of organophosphate pesticides at different biological levels using zebrafish embryos.Ann-Cathrin Haigis, Andreas Schiwy, Pim Leonards, Jessica Legradi, Henner Hollert, SETAC Europe 2020

Applicability of a multi-OMICS approach for neurotoxicity testing. Ann-Cathrin Haigis, Pim Leonards, Christian Preisinger, Lin Gan, Jessica Legradi& Henner Hollert, SETAC Europe 2021

Legradi J., Haigis A-C., Gundlach M., Di Paolo C. Hollert H., How to assess neurotoxicity SETAC-GLB 2017, Neustadt an der Weinstrasse, Germany

Posterpräsentationen

The NeuroBox Project. Jessica Legradi, Ann-Cathrin Haigis, Michael Gundlach, Carolina Di Paolo, Marc Spehr, Björn Kampa, Henner Hollert (2017): SETAC GLB

Thyroid disruption and its effects on the neuronal development in zebrafish. Ann-Cathrin Haigis, Carolina Di Paolo, Jessica Legradi, Henner Hollert (2017): SETAC GLB

Legradi J., Haigis A-C., Gundlach M., Di Paolo C., Spehr M., Kampa B., Hollert H.; The NeuroBox Project; TN2 conference 2017, Amsterdam, Netherlands

Thyroid disruption and its effects on the neuronal development in zebrafish. Ann-Cathrin Haigis, Carolina Di Paolo, Jessica Legradi, Henner Hollert (2018): SETAC Europe

Development of an integrated multi-endpoint methodology to investigate neurotoxicity of organophosphate insecticides in early life-stages of zebrafish, Jonas Nelles, Ann-Cathrin Haigis, Andreas Schiwy, Henner Hollert, Young Water Researchers Symposium 2018

Haigis A-C., Legradi J., Hollert H.; Effekte von Thyroid disruptoren auf die neuronale Entwicklung des Zebrabärblings; SETAC-GLB 2018, Muenster, Germany

Legradi J., Haigis A-C., Gundlach M., Di Paolo C., Spehr M., Kampa B., Hollert H.; The NeuroBox Project; SETAC Europe 2018, Rome, Italy

Legradi J., Haigis A-C., Gundlach M., Schiwy A., Hollert H.; The NeuroBox Project; INA 2019, Duesseldorf, Germany

BMBF-RiSKWa - Verbundvorhaben

"Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf- Neurobox"

Teilprojekt 4 Förderkennzeichen: 02WRS1419D

Zuwendungsempfänger: Hochschule Darmstadt, FB Chemie und Biotechnologie, Abtlg. Zellbiologie

Projektleiter: Prof. Dr. Dieter Pollet, Dr. P. Waldmann

Projektlaufzeit: 3 Jahre (bis 29.02.2020)

Abschlußbericht

In Vitro-Charakterisierung paralleler neuro-entwicklungstoxischer und endokriner Stoffwirkungen zur Identifikation diskriminierender Biomarker.

Berichtszeitraum: 1.03.2017 – 30.04.2020, Corona-bedingte Schließung der Labore, kostenneutral verlängert bis August 2020, Verlängerung bis 31.12.2020

Datum Abschlussbericht: Juni 2021

1. Inhalt

2.	Kurze Darstellung	3
	2.1. Aufgabenstellung	3
	2.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
	2.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	3
	2.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	4
	2.4.1 wissenschaftlicher Stand	4
	2.4.2 Technischer Stand	5
	2.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	6
3.	Eingehende Darstellung	6
	3.1 Verwendung der Zuwendung im Einzelnen und Resultate	6
	3.1.1 Verwendung der Zuwendungen	6
	3.1.2 Resultate des Forschungsvorhabens	12
	3.1.2.1 Ergebnisse mit dem Rekombinierten Hefetest	12
	3.1.2.2 Ergebnisse mit dem embryonalen Stammzelltest (EST) nach ECVAM	17
	3.1.2.3 Erweiterter EST – Neurale Differenzierung	24
	3.1.2.3.1 Neurale Differenzierung mit Carbamazepin	27
	3.1.2.3.2 Neurale Differenzierung (erweiterter EST) mit Nonylphenol	33
	3.1.2.3.3 Neurale Differenzierung (erweiterter EST) mit Bisphenol A	42
	3.1.2.4 Untersuchungen auf Neurotoxizität mit neuralen Stammzellen des Menschen	48
	3.1.2.4.1 Nachweis von Zytotoxizität an neuralen Stammzellen	50
	3.1.2.4.2 Nachweis neuraler Marker in ReNCells mittels RT-PCR unter Einfluss von Nonyl	phenol 53
	3.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	57
	3.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	57
	3.4 Darstellung des voraussichtlichen Nutzens	57
	3.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens an anderen Stellen	58
	3.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse	58
4.	4. Erfolgskontrollbericht	59
5.	Abbildungsverzeichnis	60
6.	Tabelleverzeichnis	

2. Kurze Darstellung

2.1. Aufgabenstellung

Im Forschungsverbund ToxBox wurden in vitro Teststrategien zur Beurteilung von anthropogenen Spurenstoffen im Wasserkreislauf entwickelt. Dabei wurde deutlich, dass im Bereich Neurotoxikologie Weiterentwicklungen erforderlich sind. Vor allem entwicklungsneurotoxische Wirkungen sind aufgrund der hohen Komplexität der Vorgänge nur über eine Vielzahl von verschiedenen Endpunkten abzubilden. Bei der Entwicklung des Gehirns spielen Hormone wie Thyroxin und Östradiol eine große Rolle. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass viele Stoffe, die eine hormonartige z.B. eine östrogene Wirkung aufweisen, auch ein neuro-entwicklungstoxisches Potenzial besitzen (Grandjean & Landrigan, 2006). Aufgabe dieses Teilprojektes war es neben der Erfassung allgemein neurotoxischer Endpunkte anhand von ausgewählten Substanzen, Marker zu finden, die nur hoch oder herabreguliert werden, wenn ein Stoff sowohl östrogen als auch neuro- oder entwicklungs-neurotoxisch wirkt.

2.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.

Der Antragsteller verfügt über langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der endokrinen Disruptoren in der Umwelt, vor allem in Abwasser- und Oberflächenwasserproben und der Entwicklung und Optimierung von toxikologischen in-vitro-Testverfahren.

Durch eine Vielzahl von Forschungsprojekten und der Mitarbeit in DIN-Arbeitskreisen in den Bereichen Nachweis von gentoxischen und endokrinen Potentialen in Wasserproben sowie der Optimierung, Standardisierung und Validierung von entsprechenden Testsystemen hat sich der Antragsteller eine Kompetenz erarbeitet, die für die Entwicklung von Nachweisen für Neurotoxizität und/oder Neuro-Entwicklungstoxizität eine gute Basis darstellen.

Das Methodenspektrum des Antragstellers beinhaltet verschiedenste in-vitro-Methoden zum Nachweis von unterschiedlichen Toxikologischen Endpunkten wie Gentoxizität/ Mutagenität, Zytotoxizität, östrogene und androgene Wirkungen sowie Entwicklungstoxizität. Neben der Vielzahl von toxikologischen Methoden verfügt der Lehrstuhl auch über gängige molekularbiologischen biochemischen Methoden wie PCR, RT-PCR, ELISA, Immunhistologie und Western Blot.

2.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Planung und Durchführung des Projektes gliederten sich entsprechend des Projektantrages in die unten genannten Arbeitspakete. Änderungen in der Durchführung der Arbeitspakete ergaben sich weitgehend Corona-bedingt in den letzten Arbeitspaketen. AP3 und AP4 wurden auch aufgrund der Verzögerung der Lieferung von neuralen Stammzellen später durchgeführt.

Gliederung der Arbeiten:

AP1: Testen der Substanzen auf östrogene Wirkungen mit dem Rekombinierten

Hefetestsystem.

Testen der Substanzen mit dem Embryonalen Stammzelltest (EST) nach ECVAM. Weiterentwicklung des EST zum Nachweis von neurotoxischen/ neuroentwicklungstoxischen Wirkungen.

- AP2: Literaturrecherche zu neuralen Markern Testen von Substanzen mit dem EST,
- AP3: Testen der Substanzen mit neuralen Stammzellen auf Neurotoxizität. Testen von Substanzen mit dem erweiterten EST. Nachweis von neuralen Markern mittels Western Blot und RT-PCR.
- AP4: Nachweis von neuralen Markern unter Einfluss östrogener Substanzen mittels RT-PCR an embryonalen und neuralen Stammzellen. Ermittlung der Rolle des Östrogenrezeptors bei neuralen Stammzellen.

2.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.

2.4.1 wissenschaftlicher Stand

Im Forschungsverbund "Tox-Box" wurden *In-vitro*-Teststrategien zur Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen bezüglich der bewertungsrelevanten Endpunkte (Gen- und Neurotoxizität, endokrine Verbindungen) entwickelt. Diese erlauben mit ausreichender Sicherheit in Bezug zum Konzept der gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW), umgangssprachlich GOW-Konzept genannt, eine orientierende Festlegung von numerischen Werten, die im Sinne der Vorsorge die Grundlage für die Festlegung von Maßnahmenoptionen bilden. Nach Abschluss des Tox-Box-Projektes musste festgestellt werden, dass der Stand der Entwicklung für den Endpunkt Neurotoxizität nicht ausreichend ist und Weiterentwicklungen erforderlich waren.

Auf der "3rd International Conference on Alternatives for Developmental Neurotoxicity Testing (DNT3)" im Jahr 2011 im italienischen Varese waren sich über 100 Experten aus Europa und den USA darüber einig, dass Daten zur (Neuro-)Toxizität mittels *In-vitro*-Testbatterien, die verschiedene relevante Endpunkte berücksichtigen, erhoben werden müssen (Bal-Price et al., 2012). Gleichzeitig wird aber auch eingeräumt, dass die Entwicklung geeigneter Modelle zur Interpretation von *In-vitro*-Daten zur Bewertung eines Risikos für den Menschen noch lange nicht abgeschlossen ist (Grummt 2016).

Vor dem Hintergrund, dass viele endokrin-wirkenden Stoffe auch ein neuro- oder neuroentwicklungstoxisches Potential haben, wurden derartige Stoffe in das Projekt miteinbezogen. Gerade in den letzten Jahren wächst weltweit immer mehr die Besorgnis bezüglich der humanen Exposition gegenüber - oftmals ubiquitär vorkommenden -Industriechemikalien, die zu adversen Beeinträchtigungen der menschlichen Gesundheit führen, indem sie die Funktion des endokrinen Systems stören, den sogenannten Endokrinen Disruptoren (ED oder endocrine disrupting chemicals, EDC). Deshalb sehen Behörden und Wissenschaftler momentan den dringenden Bedarf die regulatorischen Anforderungen für die Bewertung von EDCs zu verfeinern und Teststrategien und Methoden zu verbessern und anzupassen.

Vor allem die nachteilige Wirkung von EDs auf das sich entwickelnde Nervensystem - Neuro-Entwicklungstoxizität (DNT, neuro-developmental toxicity) wird durch die momentan verwendeten toxikologischen in vitro-Testmethoden kaum abgebildet (Bal-Price et al., 2018). Der oder die Mechanismus-men, dem diese Wirkung zugrunde liegt ist/sind nicht bekannt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass mit dieser neurotoxischen oder neuro-entwicklungstoxischen Wirkung ein endokriner Wirkmechanismus einhergeht oder zugrunde liegt. Das Gehirn ist gegenüber toxischen Stoffen ein besonders anfälliges Organ. Im letzten Jahrzehnt gab es eine ganze Reihe von epidemiologische Studien, die eine positive Assoziation der prä- oder postnatalen Exposition mit endokrin-wirksamen Stoffen wie Pestiziden, Flammschutzmitteln, Phthalaten, PCBs und Alkylphenolen und Neuroentwicklungsstörungen wie Autismus und Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom sowie verminderter Intelligenz bei Kindern aufzeigten (Miodovnik et al. 2011; Kim et al., 2009; Testa et al., 2011; Betts, 2014; De Cock et al, 2012). Die neurale Entwicklung ist ein hoch komplexer biologischer Prozess, der Zellteilung, Migration, Apoptose, Differenzierung, die Genese der Synapsen, die Ausbildung von Neuriten und neuronalen Netzwerken sowie die Gliogenese und die Ausbildung von Myelinscheiden beinhaltet. Alle diese Prozesse benötigen einen korrekten zeitlichen Ablauf und eine komplex gestaltete Mikroumgebung. Um ein umfassendes Bild über mögliche Störungen dieser Prozesse zu erhalten, ist der Nachweis eines einzelnen Endpunktes oder die Beschränkung auf nur einen Zelltyp nicht ausreichend. Erschwerend kommt hinzu, dass die Regulation dieser neuralen hormonell erfolgt. Testendpunkte Neurotransmitterfreisetzung, Entwicklung wie Immunfärbungen von Markern, Nachweis von Markern auf RNA-und Proteinbasis, Zellfunktionstests, die Erfassung einer zelltypspezifischen Morphologie sowie Änderungen in der Zelldifferenzierung, insbesondere über hormonelle Wirkungen, kommen als Nachweis von neurotoxisch-endokriner Wirkungen in Frage.

2.4.2 Technischer Stand

Die Abteilung Zellbiologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie und Biotechnologie verfügt seit vielen Jahren über Erfahrung mit Zellkulturen sowie den verschiedensten toxikologischen in vitro-Verfahren. Etablierte für das Forschungsprojekt geeignete Testmethoden sind das Rekombinierte Hefe-Assay zum Nachweis von östrogenen und androgenen Wirkungen (Coldham et al., 1998), der MTT-Test zum Nachweis von Zytotoxizität mit verschiedenen Zelllinien sowie der embryonale Stammzelltest nach ECVAM mit embryonalen Maus-Stammzellen (D3-Zellen). Der embryonale Stammzelltest ist durch die Zugabe von Retinsäure für neuroentwicklungs-toxikologische Fragestellungen erweiterbar, wie erste Untersuchungen von Visan (2011) zeigten.

2.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

- Umweltbundesamt (Koordinator, Dr. T. Grummt) Bad Elster
- Universität Heidelberg, Prof. Dr. Thomas Braunbeck
- > RWTH Aachen, Prof. Dr. H. Hollert jetzt Universität Frankfurt
- Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau
- Helmhotz-Zentrum f
 ür Umweltforschung, Leipzig

3. Eingehende Darstellung

3.1 Verwendung der Zuwendung im Einzelnen und Resultate

3.1.1 Verwendung der Zuwendungen

Die Zuwendungen wurden entsprechend der Zielsetzung im Projektantrag eingesetzt. Im Folgenden sollen am Beispiel einzelner Arbeitspakete die Verwendung der Zuwendungen dargelegt werden.

<u>AP1:</u> Für die Untersuchungen von ausgesuchten Substanzen auf östrogene Wirkungen wurde das Rekombinierte Hefetestsystem verwendet. Die östrogenen Aktivitäten der Substanzen wurden mit Hilfe von studentischen Hilfskräften ermittelt. Die Konzentrationsbereiche der Substanzen wurden in folgenden Experimenten zum Nachweis von neuro- und neuroentwicklungstoxischen Wirkungen genutzt, um sicherzustellen, dass die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen auch im endokrinen Wirkbereich liegen.

Für den embryonalen Stammzelltest (EST) wurden neue D3-Zellen bestellt, um die Substanztestungen mit Zellen in niedrigen Passagen – nach ECVAM sollten diese Zellen in Passagen > 22 nicht mehr verwendet werden – durchzuführen. Der Pluripotenzstatus dieser Zellen wurde in regelmäßigen Abständen überprüft.

D3-Zellen benötigen fötales Kälberserum (FBS) mit bestimmten Wachstumsfaktoren, die nur in speziellem, sehr teurem ES-qualifiziertem FBS oder bestimmten FBS-Chargen, die erst im Labor ausgetestet werden müssen, in ausreichender Menge vorhanden sind. An diesem Institut wurden verschiedene Chargen FBS von verschiedenen Herstellern auf Eignung getestet, um Kosten zu sparen. Es wurde eine geeignete Charge FBS detektiert und in einer Menge, die für das gesamte Projekt ausreichend war, reserviert. Die Beurteilung erfolgte durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter.

In AP1 erfolgten auch erste neurale Differenzierungsversuche mit den D3-Zellen und Einwirkung von Retinsäure. Es wurden verschiedene Medien für die neurale Differenzierung der Zellen und der optimale Zeitpunkt der Ausplattierung der Embryoid Bodies auf Zellkulturschalen untersucht. Neurale Zellen wurden mittels Immunfärbungen von spezifischen neuralen Markern wie GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).

<u>AP2</u>: Zur Selektion von Markern, die während der neuralen Differenzierung unter Einfluss von endokrinen – explizit östrogenen - Wirkungen herunter oder hinauf reguliert werden könnten, wurde von einem wissenschaftlichen Mitarbeiter eine Literaturrecherche durchgeführt. Die Selektion erfolgte nach verschiedenen Kriterien. Zum einen sollten Marker, die spezifische neurale Zelltypen anzeigen zum Einsatz kommen, um Änderungen in der Differenzierung zu diesen spezifischen Zelltypen erkennbar zu machen. Zum anderen wurden Marker gesucht, die vermehrt oder vermindert auftreten, wenn neurale Entwicklungsstörungen vorliegen. Es wurden nach o.g. Kriterien folgende Marker ausgesucht:

Nestin

Nestin (Akronym: neuroepithelial stem cell protein) ist ein Intermediärfilamentprotein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa, dass im ZNS exprimiert wird. Intermediärfilamente sind wie Mikrotubuli und Mikrofilamente Hauptbestandteile des Zytoskeletts [Sakairi et al. 2007]. Sie tragen maßgeblich zur Stabilität und Beweglichkeit der Zelle bei und übernehmen eine kontrollierende Funktion im Zellzyklus und in der Signaltransduktion. Diese Erkenntnisse sind auf Studien zurückzuführen, die eine Veränderung des Expressionsmusters von Intermediärfilamenten Gewebsverletzungen, belegen [Zou nach et al. 2006]. Intermediärfilamente umfassen mehr als 40 unterschiedliche Proteine, die basierend auf der Molekularstruktur in 6 Hauptklassen (I-VI) unterteilt werden. Klasse I und II umfassen basische und saure Keratine der Epithelzellen. Zur Klasse III gehört GFAP. Klasse IV besteht aus Neurofilamenten und Klasse V aus nukleären Lamininen. Nestin stellt das Intermediärfilament der Klasse VI dar [Michalczyk and Ziman 2005] und weist einen langen C-Terminus mit kurzem N-Terminus auf. Aufgrund des kurzen N-Terminus vermag Nestin keine Intermediärfilamente zu formieren, stattdessen interagiert es mit anderen Intermediärfilamenten und formiert auf diese Weise Heterodimere. Weiterhin kann dieser spezifische Marker in neuronalen, als auch glialen Zellen und den gemeinsamen Vorläuferzellen nachgewiesen werden [Gilyarov 2008].

GFAP

Das saure Gliafaser-Protein GFAP (*engl.: Glial fibrillary acidic protein*) ist ein 55 kDa schweres Klasse III Intermediatfilament, dass in Astrozyten und Radialgliazellen des ZNS exprimiert wird. Ein Trauma, Infektionen oder neurodegenerative Erkrankungen rufen im Gehirn den Prozess der Astrogliose hervor, sodass molekulare und morphologische Veränderungen auftreten und GFAP im erhöhten Maße exprimiert wird [Liddelow and Barres 2017].

Untersuchungen bezüglich des reifen Hirngewebes von Säugetieren zufolge wird eine GFAP Immunreaktivität primär in Prozessen, die Astrozyten involvierten, induziert. Protoplasmatische Astrozyten enthalten wenig, fibröse hingegen reichlich GFAP [Raff, 1983]. Aufgrund dessen wird GFAP als spezifischer Marker für Astrozyten angesehen.

Pax6

Pax6 (*engl.: paired box 6*) gehört zur Familie der hochkonservierten Pax-Transkriptionsfaktoren mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und wird als früher Marker für die ektodermale bzw neuroektodermale Differenzierung angesehen [Götz et al. 1998]. Pax6 wird gleich zu Beginn der Entwicklung des ZNS an Tag 8 der Embryonalentwicklung (E8.0) zunächst im Neuralrohr exprimiert und anschließend im Gehirn und Rückenmark exprimiert. Es ist an der Ausbildung des Neuralrohrs und an der Migration von Neuronen beteiligt. Zusätzlich begünstigt Pax6 die neurale Spezifität und Differenzierung in radiale Gliazellen. Als Transkriptionsfaktor aktiviert und deaktiviert Pax6 die Expression bestimmter Gene und ist somit ein wichtiger Regulator für die Proliferation und Differenzierung. Weiterhin wird die Expression dieses neurospezifischen Markers mit bestimmten Zeitmustern während der Gehirnentwicklung in Verbindung gebracht [Osumi 2001].

B-III-Tubulin

Beta-III-Tubulin ist eine von zwei Kernproteinfamilien (Alpha- und Beta-Tubuline), die sich zu Mikrotubuli zusammenfügen. Beta-3-Tubulin wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert und ist unter anderen an der Neurogenese und der Erhaltung des Axons beteiligt. Durch Mutationen in diesem Gen kann eine erbliche Fibrose der extraokularen Muskeln des Types 3 entstehen (*National Center for Biotechnology Information*, 2010).

Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog (SHH) ist entscheidend für die Strukturierung des frühen Embryos. Es ist ein wichtigstes induktives Signal für die Strukturierung der ventralen Neuralröhre. Das Hedgehog-Signal spielt außerdem eine Rolle in der Differenzierung, beim Überleben und bei der Proliferation vieler Zelltypen im embryonalen Nervensystem. Des Weiteren zeigen Studien, dass Sonic Hedgehog das Überleben und die Verbreitung von NSCs und Neuroblasten während der Neurogenese bei Erwachsenen fördert (Cai and Grabel, 2007; Komada, 2012).

Olig2

Der Oligodendrocyte Transcription Factor 2 (Olig2) gehört zu den Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren haben sich als essenziell für die Speziation verschiedener Zelltypen erwiesen. Sowohl Olig1 als auch Olig2 werden nervenspezifisch exprimiert, während Olig3 hauptsächlich in nicht-neuralem Gewebe vorkommt. Olig2 wird im Bereich der ventrikulären Zone des späten embryonalen Rückenmarks exprimiert und ist für die Ausbildung von Motoneuronen und Oligodendrozyten verantwortlich. Die Olig2-Expression ist jedoch nicht auf die Oligodendrozyten-Linie beschränkt, sondern umfasst auch zusätzlich unausgereifte neurale Vorläufer und Neuron-/Gliavorläufer, sowie embryonale olfaktorische (den Geruchssinn betreffende) Neuronen (Takebayashi et al., 2000).

VGlut

Der vesikuläre Glutamat-Transporter (engl.: Vesicular glutamate transporte, VGlut) gehört zu der Familie der Neurotransmitter-Transportproteinen und ist für die Aufnahme der Aminosäure L-Glutamat in synaptische Vesikel verantwortlich. L-Glutamat dient als wichtiger erregender Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren. Zu den Glutamat-Transportproteinen gehört neben VGlut noch der *excitatory amino acid transporter* (EAAT). Im Gehirn entfernen EAATs Glutamat aus dem synaptischen Spalt und den extrasynaptischen Stellen durch eine Glutamat-Wiederaufnahme in Gliazellen und Neuronen. VGlut hingegen transportiert Glutamat aus dem Zellzytoplasma in synaptische Vesikel. Glutamat-Transporter sind in praktisch allen peripheren Geweben vorhanden, einschließlich Herz, Leber und Knochen (Shigeri et al., 2004).

CHAT

Das Gen CHAT kodiert die Cholinacetyl-Tranferase. Die Cholinacetyl-Transferase (ChAT) überträgt eine Acetyl-Gruppe auf das Cholinmolekül und ist somit an der Synthese des Transmitters Acetylcholin beteiligt (Oda, 2000). Das Enzym kommt in cholinergen Neuronen, die sowohl im zentralen Nervensystem als auch im peripheren Nervensystem zu finden sind, in großen Mengen vor.

NeuroG2

Neurogin 2 (NeuroG2) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Schlüsselgenen reguliert, die in verschiedene Mechanismen der Entwicklung des zentralen Nervensystems involviert sind wie z.B. Proliferation von Vorläuferzellen, Migration und neurale Differenzierung. NeuroG2 kommt auch in neuralen Vorläuferzellen vor innerhalb des entstehenden zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert wird. Neurog2 spielt eine Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben von dopaminergen Neuronen (=Dopamin als Neurotransmitter enthaltend) im Mittelhirn (Chouchane et al., 2019).

NeuroD2

NeuroD2 (Neurogenic differentiation factor 2) gehört der zu der NeuroD-Familie der neurogenen basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteine. Neurogene bHLH-Transkriptionsfaktoren tragen zur Entwicklung eines großes Sortiments von Neuronen im Gehirn und im peripheren Nervensystem bei (Lin et al., 2004). Sie werden als neuronale Differenzierungsgene charakterisiert, da sie einen Zellzyklusstopp in neuronalen Vorläuferzellen hervorrufen können und somit eine Transkription von Genen induzieren, die zur Entwicklung zum reifen neuronalen Phänotyp beitragen. NeuroD1 und NeuroD2 werden unter anderem in postmitotischen Neuronen während des gesamten Erwachsenenalter exprimiert (Olson et al., 2001).

MBP

Bei dem Myelin Basic Protein (MBP) handelt es sich um ein Protein, welches wichtig für den Prozess der Myelinisierung von Nerven im Nervensystem ist. Die Myelinschicht ist eine mehrschichtige Membran, die für die Isolierung der Axone fungiert und die Impulsleitung erhöhen kann. MBP ist für die Aufrechterhaltung des Myelins verantwortlich und interagiert mit den darin befindlichen Lipiden. Des Weiteren kann MBP als Membran-Aktin-bindendes Protein fungieren, was es ihm ermöglicht, an der Übertragung extrazellulärer Signale an das Zytoskelett in Oligodendrozyten mitzuwirken.

Das Gen für die Kodierung von MBP liegt beim Menschen auf Chromosom 18 in der Region, die bei Trisomie 18 betroffen ist. Der Verlust der Myelinschicht kann zu erheblichen Krankheiten führen wie zum Beispiel Multiple Sklerose (Boggs, 2006).

Syp2

Synaptophisin (SYP) ist ein synaptisches Vesikelprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa. Es ist vor allem in neuroendokrinen Zellen vorhanden und ein Marker für neuroendokrine Tumore (Wang et al., 2019). Des Weiteren ist SYP in einer Vielzahl an Neuronen im Gehirn und Rückenmark vorhanden, die an der synaptischen Übertragung beteiligt sind. SYP wird auch als Markerprotein der präsynaptischen Nervenentwicklung verwendet. Studien haben gezeigt, dass die Eliminierung von SYP bei Mäusen Verhaltensänderungen wie erhöhtes Erkundungsverhalten, beeinträchtigte Objektneuheitserkennung und reduziertes räumliches Lernen bewirkt (Czikk et al., 2015).

SYNCa

Synuklein- α (SYNC α) ist ein lösliches Protein im Gehirn von Wirbeltieren. Es handelt sich um ein Transportproteinen, welches in der Lage ist Membrankanäle auszubilden. SYNC- α ist außerdem an der Ausschüttung von Dopamin beteiligt ist. Mutationen im Gen können Krankheiten wie Parkinson auslösen. (Singleton et al., 2003)

GAD2

Glutamatdecarboxylase (GAD) existiert bei Säugetieren in zwei Isoformen mit den Molekulargewichten von 67 und 65 kDa (GAD67 und GAD65). Diese werden von zwei verschiedenen Genen auf verschiedenen Chromosomen kodiert. Das Gen GAD2 ist für die Kodierung des Enzymes GAD65 verantwortlich, während das GAD1 Gen das Enzym GAD67 kodiert. Die beiden Enzyme werden unter anderem im Gehirn exprimiert, wo Gamma Amino-Buttersäure (GABA) als Neurotransmitter verwendet wird. Des Weiteren werden sie auch in den insulinproduzierenden β-Zellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert. GAD65 und GAD67 synthetisieren GABA an verschiedenen Stellen in der Zelle, zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten und für funktionell unterschiedliche Zwecke. GAD67 wird gleichmäßig in der Zelle verteilt, während GAD65 meist in Nervenenden lokalisiert wird. GAD65 synthetisiert GABA für die Neurotransmission und ist daher nur an Nervenendstationen und Synapsen notwendig. GAD67 wird während der frühen Entwicklung transkribiert, während GAD65 erst später im Leben transkribiert wird. Die Herunterregulierung der beiden Enzyme wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel Diabetes oder Autismus (Soghomonian and Martin, 1998).

Tyrosinhydroxylase

Tyrosinhydroxylase (TH) bildet zusammen mit Phenylalaninhydroxylase (PAH) und Tryptophanhydroxylase (TPH) die Familie der aromatischen Aminosäurehydroxylasen (AAAHs) und ist für die normale Funktion des Nervensystems wichtig. Bei TH handelt es sich um ein Enzym, das für die Katalyse der Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) verantwortlich ist. Bei der Umwandlung werden molekularer Sauerstoff (O2), Eisen (Fe2+) und Tetrahydrobiopterin als Kofaktoren verwendet. L-DOPA ist ein Vorläufer für den Neurotransmitter Dopamin. Dopamin überträgt Signale zwischen Nervenzellen im Gehirn, um körperliche Bewegung und emotionales Verhalten zu kontrollieren. Dopamin ist selbst wiederum ein Vorläufer für die wichtigen Neurotransmitter Norepinephrin (Noradrenalin) und Adrenalin ist. Das Enzym TH ist im Zentralnervensystem (ZNS), in peripheren sympathischen Neuronen und im Nebennierenmark vorhanden (*National Library of Medicine*, 2012).

IGF-1

Bei IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) handelt es sich um einen Polypetidwachstumsfaktor, der eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Insulin aufweist. IGF-1 wird hauptsächlich von der Leber ausgeschüttet. Studien haben gezeigt, dass IGF-1 eine Rolle bei der Zellproliferation und der Hemmung des Zelltods spielt. Es modelliert viele grundlegende zelluläre Prozesse in neuralen und auch in nicht-neuralen Zellen und ist demnach wichtig für die neurale Entwicklung und Funktionen. Aus diesem Grund können jegliche Faktoren, welche die IGF-1 Expression regulierten, auch neurale Effekte erzeugen, wie beispielsweise endokrin wirkende Substanzen (Huang et al., 2017).

Sox5

Sox5 (SRY-related HMG-box5) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der embryonalen Entwicklung und der Bestimmung des Zellschicksals beteiligt sind. Das kodierte Protein kann als Transkriptionsregulator fungieren, nachdem es mit anderen Proteinen einen Proteinkomplex gebildet hat. Studien haben gezeigt, dass Sox5 ein Schlüsselgen ist, welches die Transkription von Nervenzellen während der Entwicklung positiv reguliert (Huang et al., 2017).

ER-ß

Der Östrogenrezeptor (ER) besteht aus zwei Subtypen, dem ER- α und ER- β , die sich in der Cterminalen ligandenbindenden Domäne und in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne unterscheiden. Beide ERs werden im ZNS exprimiert. ER- α ist der vorherrschende ER im Hypothalamus und präoptischen Bereich und kontrolliert die Reproduktion, während ER- β nicht-reproduktive Prozesse im Gehirn beeinflusst. Er wird in der Großhirnrinde und dem Hippocampus exprimiert, wo er die Tryptophanhydroxylase (Tph2) moduliert (Varshney et al., 2017). Die Rezeptoren werden durch das Hormon Östrogen (17 β -estradiol) aktiviert. Durch die Aktivierung ist der ER in der Lage, sich in den Kern zu verlagern und an die DNA zu binden, um die Aktivität verschiedener Gene zu regulieren. ER- β spielt unter anderen eine wichtige Rolle bei der adaptiven Funktion der Lunge während der Schwangerschaft und bei vielen Krebsarten als ein potenter Tumorsuppressor, wie beispielsweise bei Prostatakrebs (Kuiper et al., 1998).

Die ausgesuchten Marker sollten während der neuralen Differenzierung von D3-Zellen und in einem zweiten Schritt mit neuralen Stammzellen unter Einfluss von östrogenwirkenden Substanzen detektiert werden. Die Detektion erfolgte auf RNA-Ebene mittel RT-PCR und (in geringerem Umfang) auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunfärbung. Hierzu wurden entsprechende Primer, reverse Transkriptase, Sybr-Green Mastermix sowie spezifische primäre und sekundäre Antikörper erworben und eingesetzt. Die Isolierung der RNA und Proteine erfolgte über entsprechende Kits der Fa. Qiagen. **<u>AP3</u>**: In AP3 sollten immortalisierte neurale Stammzellen (ReNCells, VM, Merck) für die Substanztestung eingesetzt werden. Die erste Lieferung beinhaltete nicht vitale Zellen, so dass eine weitere kostenneutrale Lieferung aus den USA erforderlich war, die jedoch zu einer zeitlichen Verzögerung des Projektes führte. Diese Zellen werden in Serum-freien Medium in mit Laminin beschichteten Kulturflaschen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF kultiviert.

Die Etablierung dieser Stammzelllinie erfolgte durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter.

Der EST wurde erweitert, indem während der Bildung von Embryoid Bodies (EBs) durch die Zugabe von Retinsäure eine neurale Differenzierung eingeleitet wurde. Diese neurale Differenzierung wurde durch fortwährende Probenahmen zur RNA- und Proteinisolierung zwecks Markerbestimmung charakterisiert. Die Expression der Marker wurden mit und ohne Substanzeinwirkung bestimmt. Die Testdauer betrug 28 Tage. Es wurden pro Substanz mindestens 2 unabhängige Experiments durchgeführt.

Die neurale Differenzierung wurde in regelmäßigen Abständen mikroskopisch beurteilt, indem aus den EBs auswachsende neurale Strukturen wie Nervenstränge je EB gezählt wurden. Diese Auswertungen erfolgten mit Hilfe von wissenschaftlichen Hilfskräften. Über Immunfärbungen wurden auch verschiedene neurale Zelltypen angefärbt.

<u>AP4</u>: Das Arbeitspaket vier war gekennzeichnet durch Substanztestungen mit den neuralen Stammzellen, die verspätet geliefert wurden. Hierbei wurden reine Zytotoxizitätstests durchgeführt, aber auch einige wenige Differenzierungsversuche unter Substanzeinfluss. Diese Zellen erwiesen sich als sehr sensitiv gegenüber östrogen wirkenden Testsubstanzen wie Nonylphenol und Dichloranilin. Durch die Hemmung des Östrogenrezeptors wurde überprüft, ob diese hohe Vulnerabilität auf einem östrogenen Wirkungsmechanismus beruht. Es konnte festgestellt werden, dass die stark zytotoxische Aktivität der Substanzen nicht über den Östrogenrezeptor vermittelt wird. Ob andere östrogene Wirkpfade bei diesem Phänomen eine Rolle spielen, war aus zeitlichen Gründen nicht ermittelbar.

Weiterhin wurden in AP4 Substanzen mit dem EST auf Embryotoxizität untersucht.

3.1.2 Resultate des Forschungsvorhabens

Die hier aufgeführten Resultate wurden weitgehend aus Forschungsberichten sowie Bachelorund Masterarbeiten, die während des Projektes durchgeführt wurden, zusammengestellt. Es handelt sich dabei um die Bachelorarbeiten von Ayca Turgut (2018), Stefan Laubenstein (2019), Nils Henzel (2020) und Nadine Duschek (2020) sowie die Masterarbeiten von Romy Kuhn (2018), Timo Mews (2018), Sabine Schütz (2019) und Mareike Lang (2019).

3.1.2.1 Ergebnisse mit dem Rekombinierten Hefetest

Zum Nachweis endokrin wirkender Substanzen wurde der rekombinante Yeast-Estrogen-Assay (RYE-Assay, McDonnell et al. 1991) durchgeführt. Der RYE-Assay basiert auf gentechnisch

modifizierten Hefezellen, die mit der DNA-Sequenz eines humanen Estrogenrezeptor (human estrogen receptor, hER) transfiziert wurden. Das Gen hER wird in Anwesenheit von Kupfer abgelesen und der Estrogen - Rezeptor synthetisiert. Darüber hinaus wurde ein Expressionsplasmid mit einer östrogenbindenden Sequenz (ERE, estrogen responsive elements) und dem lac-Z-Reportergen, dass das Enzym ß-Galaktosidase kodiert, implementiert. In x ist die schematische Funktionsweise des Hefetests dargestellt. Nach Bindung hormonaktiver Substanzen an den Östrogen-Rezeptor kommt es zur Bildung eines Substrat-Rezeptor-Komplexes, basierend auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Der aktive Rezeptor bindet an die östrogenspezifische Sequenz (ERE), sodass die Transkription des nachgeschalteten Lac-Z-Gens zur Synthese des ß-Galaktosidase Enzyms führt. Die quantitative Bestimmung der ß-Galaktosidase-Aktivität erfolgt mit dem Substrat **ONPG** (*o*-Nitrophenyl-β-Dgalactopyranosid), dass durch die ß-Galaktosidase hydrolysiert wird. Dabei entstehen die beiden Reaktionsprodukte
ß-D-Galaktose undo-Nitrophenol. Letzteres ist ein gelber Farbstoff, der durch die Hydrolyse bei positiven Proben freigesetzt wird und photometrisch bestimmt werden kann [Bazin, 2013]. Die Ergebnisse wurden aus verschiedenen Abschlussarbeiten zusammengestellt (Kuhn 2018, Mews 2018, Henzel 2020, Tox Box-Abschlussbericht)



Abbildung 1: Schema des Rekombinierten Hefetests

Das rekombinierte Hefetestsystem ist eine sensitive in vitro-Methode zum Nachweis von östrogenen Wirkungen, die östrogene Wirkung von 17-ß-Östradiol kann schon im pM-Bereich nachgewiesen werden (Abb. 2)

Mit dem Testsystem wurden die Substanzen, die auch auf neurotoxische Wirkungen untersucht wurden, getestet.

Substanz	östrogen
17-β-Östradiol	ja
3,4-Dichloranilin	ja
2,4-Dichlorphenol	ja
Genistein	ja
Bisphenol A	ja
Nonylphenol	ja
Carbamazepin	nein
Venlafaxin	nein
Valproat	nein
Dichlorvos	nein
ТСРР	nein

Tabelle 1: Östrogene Wirkung der Testsubstanzen im Rekombinierten Hefetest ohne externe metabolische Aktivierung



Abbildung 2: Östrogene Wirkung von 17.ß-Östradiol im Rekombinierten Hefetest (R-YES)



Das Hormon 17-ß-Östradiol zeigt im R-YES schon im pikomolaren Bereich eine östrogene Wirkung. Bisphenol A weist hingegen erst im oberen nanomolaren Konzentrationsbereich eine östrogene Wirkung auf.



Abbildung 4: Östrogene Wirkung von 3,4-Dichloranilin im R-YES.





Abbildung 6: Östrogene Wirkung von Ethinyl-Estradiol im R-YES



Abbildung 7: Östrogene Wirkung von 2,4-Dichlorohenol im R-YES.

Aus den Untersuchungen der Substanztestung mit dem Rekombinierten Hefetest ergaben sich erwartungsgemäß (Coldham, 1997, ToxBox-Abschlussbericht) Unterschiede in der östrogenen Potenz wie folgt: Ethinyl- Estradiol > 17-ß-Östradiol > Nonylphenol > Bisphenol A > 2,4-Dichlorphenol > 3,4-Dichloranilin

3.1.2.2 Ergebnisse mit dem embryonalen Stammzelltest (EST) nach ECVAM

Der EST besteht aus drei toxikologischen Untersuchungen: Dem MTT-Test mit einer Fibroblastenzelllinie der Maus (3T3-Zellen, Fibroblasten aus dem Embryo) zum Nachweis von Zytotoxizität, dem MTT-Test mit den embryonalen Stammzellen der Maus (D3-Zellen, mit LIF) und einem Differenzierungsassay mit den D3-Zellen (ohne LIF).

Die D3-Zellen sind pluripotent und können sich zu allen spezies-spezifischen Zelltypen entwickeln, wenn ein spezielles Protein (LIF), das zur Erhaltung des Stammzellcharakters erforderlich ist, fehlt. Für das Differenzierungsassay kultiviert man die Zellen im sog. Hanging Drop-Verfahren. Man pipettiert 20 µl einer definierten Zellsuspension auf die Innenseite des Deckels einer Petrischale und inkubiert diese für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % Luftfeuchte. In diesen hängenden Tropfen bilden sich Zellhaufen, die als Embryoid Bodies (EBs) bezeichnet werden. Diese werden zunächst in Petrischalen in Suspension weiterkultiviert und danach zur Adhäsion in 24-well Platten transferiert. Dort bilden diese EBs nach insgesamt 10 Tagen verschiedenste Zelltypen aus. Unter anderen werden Kardiomyozyten gebildet, die sich als kontraktile Areale im Mikroskop hervorheben. Pro Testansatz werden 24 EBs gewertet. Endpunkt ist die Anzahl der EBs, die sich kontrahierende Areale mit Herzmuskelzellen besitzen. In der Negativkontrolle müssen das nach ECVAM mindestens 21 EBs sein.



Abbildung 8: Kultivierung von embryonalen Satmmzellen im Hanging Drop-Verfahren, Embryoid Bodies

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Kardiomyozyten in Embryoid Bodies (EBs)



Abbildung 9: Nachweis von Cardiomyozyten, die aus embryonalen Stammzellen differenziert wurden.

- a. Cardiomyozyten, dargestellt durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen α-sarcomeric-Aktinin (1:800) und Anti Maus IgG FITC- konjugiert (1:50) Vergrößerung: 180x
- kernfärbung desselben Ausschnittes an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 (Verdünnung 1:10000)
 Vergrößerung: 180 x
- c. Aus Embryonalen Stammzellen differenzierte Cardiomyozyten, dargestellt nach indirekter
 Immunfluoreszenzfärbung gegen α-sarcomeric-Aktinin (1:800) über Anti Maus IgG Biotin-konjugiert (1:1600) und
 Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin (1:500); Vergrößerung: 320x
- Kernfärbung desselben Ausschnittes an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 (Verdünnung 1:10000)
 Vergrößerung: 320x

Es wurden verschiedene Chargen verschiedener Hersteller von fötalem Kälberserum (FBS) auf Eignung für das Differenzierungsassay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung X dargestellt.



Abbildung 10: Untersuchung von verschiedenen Chargen FBS im EST-Differenzierungsassay.

Von den neun getesteten FBS-Chargen konnten drei für den EST verwendet werden – die Anzahl der EBs mit sich kontrahierenden Herzmuskelzellen in der Negativkontrolle war größer als 21.

Die von der Zellbank ATCC bezogenen D3-Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mittels Immunfärbung des Pluripotenzmarkers Oct-4 (octamer-binding transkription factor) auf Pluripotenz untersucht. Ein Beispiel dieser Färbung ist in Abb. X aufgeführt. Bei Oct-4 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der im Zellkern vorzufinden ist. Ausdiesem Grund entspricht die Oct-4-Färbung (grün) der Färbung der DNA mit DAPI (blau).



a: Nachweis von Oct-4 (IF) - Marker für Pluripotenz b: zu a gehörige Dapi-Färb. c: NK mit nur sek. Antikörper d: zu c gehörige Dapi-Färb.

Neben der Negativkontrolle dient im EST - wie auch in anderen toxikologischen Untersuchungen - eine Positivkontrolle zur Beurteilung der Testergebnisse. Im EST wird 5-Fluorouracil als Positivkontrolle verwendet. Die Ergebnisse der Positivkontrolle sind in den Abbildungen 12-15 dargestellt.



Abbildung 12: Bestimmung der IC50 von 5-Fluorouracil im MTT-Test mit 3T3-Fibroblasten (N=2).



Abbildung 13: Bestimmung der IC50 von 5-Fluorouracil im MTT-Test mit D3-Zellen (N=3).



Abbildung 14: Ergebnisse des Differenzierungsassay mit 5-Fluorouracil mit D3-Zellen (N=3).



Abbildung 15: Bestimmung der ID50 aus den Differenzierungsassays mit 5-Fluorouracil.

Für die Einschätzung des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz wurde das, in Validierungsstudien erstellte, statistische Prädiktionsmodell (engl.: *iPM= improved Prediction Model*) herangezogen (Tab. 2) und mit einer linearen Diskriminanzanalyse erstellt. Die drei linearen Diskriminanzfunktionen (I-III) umfassen die Halbhemmkonzentrationen ID₅₀ der embryonalen D3 Zellen, sowie die im MTT-Assay erzielten IC₅₀ Werte bezogen auf 3T3 Fibroblasten und D3 Zellen. Die Werte der Funktionen werden mit Klassifizierungskriterien verglichen und den Embryotoxizitätsklassen 1-3 zugeordnet (Klasse 1: nicht embryotoxisch, Klasse 2: schwach embryotoxisch, Klasse 3: stark embryotoxisch) [ECVAM Protokoll].

Tabelle 2: Lineare Diskriminanzfunktionen des validierten Prädiktionsmodells des EST mit drei Klassifizierungskriterien der Embryotoxizität

Funktion I	5,916 lg (IC ₅₀ 3T3) + 3,500 lg (IC ₅₀ D3) – 5,307 [(IC ₅₀ 3T3 – ID ₅₀) / IC ₅₀ 3T3] – 15,27
Funktion II	3,651 lg (IC ₅₀ 3T3) + 2,394 lg (IC ₅₀ D3) – 2,033 [(IC ₅₀ 3T3 – ID ₅₀) / IC ₅₀ 3T3] – 6,85
Funktion III	- 0,125 lg (IC ₅₀ 3T3) – 1,917 lg (IC ₅₀ D3) + 1,500 [(IC ₅₀ 3T3 – ID ₅₀) / IC ₅₀ 3T3] – 2,67

Klasse 1	Nicht embryotoxisch	wenn	I	>	II	und	I	>	III
Klasse 2	Schwach embryotoxisch	wenn	II	>	I	und	11	>	
Klasse 3	Stark embryotoxisch	wenn	III	>	I	und	III	>	

Die Klassifizierung von 5-Fluorouracil nach dessen embyotoxischen Potentials erfolgte mittels Diskriminanzanalyse. Die Auswertung basiert auf einer Gegenüberstellung der drei Endpunkte. Hierbei wurden die ermittelten ID₅₀ und IC₅₀ Werte des Differenzierungs- und MTT-Assays in die Diskriminanzfunktionen nach ECVAM eingesetzt und die errechneten Werte den Embryotoxizitätsklassen zugeordnet (Tabelle 32). Die IC₅₀ und ID₅₀ Werte sowie die Ergebnisse der einzelnen Funktionen mit Klassifizierung von 5-Fluorouracil sind in Tabelle 4 aufgeführt. Hierbei wird 5-Fluorouracil als stark embryotoxisch eingestuft. (IC₅₀ = Konzentration bei der 50 % Wachstumshemmung auftritt, ID₅₀ = Konzentration bei der 50 % Differenzierungshemmung auftritt)

Tabelle 3: Diskriminanzanalyse von 5-Fluorouracil

Funktion I	5,916 lg (0,18) + 3,500 lg (0,098) - 5,307 [(0,18 - 0,053) / 0,18] - 15,27
Funktion II	3,651 lg (0,18) + 2,394 lg (0,098) - 2,033 [(0,18 - 0,053) / 0,18] - 6,85
Funktion III	$0,125 \lg (0,18) - 1,917 \lg (0,098) + 1,500 [(0,18 - 0,053) / 0,18] - 2,67$

Parameter	5-Flourouracil		
$ID_{so}D3 (mg/L)$	0.053		
$IC_{10} 2T3 (mg/L)$	0.18		
$IC_{50} J J J (IIIg/L)$	0,10		
$IC_{50}D3 \text{ (mg/L)}$	0,098		
Funktion I	-26,95		
Funktion II	-13,42		
Funktion III	0,42		
Klassifizierung	stark embryotoxisch		

Tabelle 4: Klassifizierung von 5-Fluorouracil nach dem Prädiktionsmodell

Nach ECVAM sollte die IC50 von 5-Fluorouracil zwischen 0,48 und 0,6 μ g/mL liegen. Mit einer mittleren ID₅₀ (N=5) von 0,53 war dies der Fall.

Mit dem EST wurden 10 Substanzen, die im Verdacht stehen eine neurotoxische Wirkung zu besitzen, auf ihr embryotoxisches Potenzial hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Substanz	Konzentrations- bereich (mg/L)	östrogen	Bewertung embryotoxisch
5-Fluorouracil	0,006 - 0,78	nein	stark (N=5)
Nonylphenol (NP)	0,25 - 5	östrogen	stark
Carbamazepin	0-10	nein	nicht
Bisphenol A	0,034-30,4	östrogen	nicht
TCPP Tris(2- chlorisopropyl)phosphat	0,32-16	nein	schwach
Valproat	0,016 - 2,5	nein	schwach
3,4-Dichloranilin	0,5 - 30	östrogen	nicht
Genistein	0,5 - 40	östrogen	stark
Venlafaxine	9 - 300	nein	nicht
2,4-Dichlorphenol	0,1 - 30	östrogen	nicht
Dichlorvos	0,5 - 10	nein	nur D3 und 3T3 IC50

Tabelle 5: Ergebnisse des Embryonalen Stammzelltests mit den Testsubstanzen.

Einige dieser Substanzen wirken auch östrogen andere nicht. Nonylphenol und Genistein zeigten eine starke embryotoxische Wirkung im EST. TCPP und Valproat wiesen eine schwach embryotoxische Wirkung auf, während Venlafaxine, Carbamazepin, Bisphenol A, und 3,4-Dichloranilin und Dichlorphenol nicht embryotoxisch im EST waren. Mit Dichlorvos konnte das Differenzierungsassay Covid-19-bedingt nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse von Genistein stimmen mit den Ergebnissen von Kong et al. (2013) überein. Bisphenol A war bei Kong et al. in höheren Konzentrationen embryotoxisch. In diesem Forschungsvorhaben variierten die Ergebnisse des MTT-Tests mit 3T3-Fibroblasten stark, so dass in den getesteten Konzentrationen kein Effekt nachzuweisen war. Valproat zeigte auch in einer Studie von Van Oostrom et al. (2020) ein schwach embryotoxisches Potenzial.

3.1.2.3 Erweiterter EST – Neurale Differenzierung

Unter neuraler Differenzierung versteht man die Bildung von Gehirn-spezifischen Zellen wie Neuronen und Gliazellen aus neuralen Stammzellen oder embryonalen Stammzellen. Für den erweiterten EST wurde schon während der Hanging Drop-Kultivierung dem Medium Retinsäure zugefügt. Retinsäure leitet die neurale Differenzierung ein (Beijer et al. 2014; Yang et al. 2017). Die Kultivierung der Embryoid Bodies erfolgte über 28 Tage in Anlehnung an die Methode von Visan et al. (2012). In regelmäßigen Abständen wurden EBs entnommen zur Extraktion von Proteinen und mRNA für die Marker Bestimmung. Die EBs wurden während der Differenzierung auch morphologisch begutachtet und auswachsende Nervenstränge durch Zählen quantifiziert. Die Exposition mit den Testsubstanzen erfolgte während der gesamten Kultivierung – mit Ausnahme der Negativkontrolle.

Zur Bestimmung der fortschreitenden neuralen Differenzierung wurden Immunfärbungen von zellspezifischen Marker, wie z.B. GFAP als Astrozytenmarker und ß-III-Tubulin als Neuronenmarker durchgeführt.



Abbildung 16: Embryoid Body ohne die Induktion der neuralen Differnzierung durch Retinsäure (Tag 14, 100x).



Abbildung 17: Embryoid Body mit der Induktion der neuralen Differenzierung durch Retinsäure (Tag 17, 100x).





Abbildung 19: Immunzytochemischer Nachweis von GFAP, Nestin und Pax6 neural differenzeirter D3-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung von (A) GFAP (B) Nestin und (C) Pax 6. Dazugehörige Phasenkontrastaufnahme (D,E,F) und DAPI Zellkernfärbung (G,H,I). Negativkontrolle mit CruzFluor TM 488 (J), Cy3 (K) und DyLight 488 (L). Maßstab=10 μ m (Romy Kuhn, 2018)



Abbildung 20: Astrozyten aus D3-Zellen differenziert und durch Immunfärbung von GFAP Fluoreszenz-markiert.



Abbildung 21: Neuronale Zellen, nachgewiesen durch den neuronalen Marker ß-III-Tubulin via Immunfärbung.

Der erweiterte EST wurde aufgrund der langen Inkubationszeit von 28 Tagen nur mit 3 Substanzen durchgeführt. Es wurden mindestens 2 unabhängige Experimente pro Substanz durchgeführt. Die untersuchten Testsubstanzen waren Nonylphenol, Bisphenol A und Carbamazepin.

3.1.2.3.1 Neurale Differenzierung mit Carbamazepin

Carbamazepin (CBZ) ist eine trizyklische Verbindung, die chemisch mit trizyklischen Antidepressiva mit antikonvulsiven Eigenschaften verwandt ist. Es dient sowohl zur Kontrolle psychomotorischer oder fokaler Anfälle als auch zur Stabilisation der Stimmung. Die physiologische Wirkung von Carbamazepin beruht auf einer gestörten elektrischen Aktivität des zentralen Nervensystems. Es übt seine antikonvulsive Wirkung aus, indem es polysynaptische Reaktionen reduziert und die postetanische Potenzierung blockiert (Tolou-Ghamari et al. 2013).

Der Wirkungsmechanismus von Carbamazepin ist wie der eines Cytochrom P450-Induktors. Die Cytochrome P450 (CYP) sind eine Familie von Enzymen, die für den oxidativen Metabolismus von Fremdstoffen wie Arzneimitteln von zentraler Bedeutung sind. Sie sind am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und ihre Expression wird durch Glucocorticoide und einige Fremdstoffe induziert. Für Carbamazepin haben Studien gezeigt, dass CYP3A4 das Hauptenzym ist, das die Bildung von CBZ-10,11-Epoxid (CBZ-E) katalysiert (Levy 1995).

Carbamazepin wird zu 95-98% im Körper abgebaut, ca. 2-3 % werden jedoch unverändert wieder ausgeschieden und gelangen so in Abwässer. Dort ist Carbamazepin schwer abbaubar (Schramm et al., 2006).

Carbamazepin zeigte im EST kein embryotoxisches Potenzial, getestet wurde bis zu einer Konzentration von 42μ M. Bei dieser Konzentration trat keine toxische Wirkung im MTT-Test und in Differenzierungsassay auf (siehe Abbildungen 22-23, Turgut 2018).



Abbildung 22: Ergebnisse von Carbamazepin im MTT-Tests mit D3-Zellen.



Abbildung 23: Ergebnisse von Carbamazepin im Differenzierungsassay mit D3-Zellen.

Der MTT-Test mit Carbamazepin wurde mit und ohne Rattenleberhomogenat (S9-Mix) durchgeführt. Das Leberhomogenat, das Cytochrome P450-Enzyme enthält erhöht im Testansatz die metabolische Kompetenz.

Carbamazepin ist ein bekanntes Teratogen. Die Einnahme von Carbamazepin durch Schwangere Frauen führte zu kongenitalen Anomalien bei deren Föten wie Neuralrohrdefekten (Jones et al., 1989; Shepard et al., 2002). In anderen Studien mit den gleichen Zellen, jedoch anderen Endpunkten wie Differenzierungsverläufe anhand von Gewebe-spezifischen Markern, erwies sich Carbamazepin als embryotoxisch (Murabe et al., 2007; Schulpen et al., 2015). Qureshi et al. (2014) fanden in einem dem EST vergleichbaren Test eine verminderte Anzahl von kontraktilen Myokardgewebe-Foci nach Carbamazepinexposition bei Konzentrationen von $50-400 \mu$ M.
Morphologische Unterschiede in der neuralen Differenzierung

Nach Einleitung der neuralen Differenzierung wurden die EBs regelmäßig fotografiert, um den Verlauf der Differenzierung verfolgen zu können. Dabei wurden die Fotos immer an Tagen der Probeentnahmen aufgenommen. Die Probenahmen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 und 28. Parallel zu den Bildern der neuralen Differenzierung ohne Substanz, welche die Negativkontrolle darstellten, wurden Bilder der Differenzierung unter Zugabe von 42µMol (10 mg/L) Carbamazepin festgehalten und in den Abbildungen 24 bis 27 miteinander verglichen. Die Fotos wurden jeweils in den gleichen Bereichen der Embryoid Bodies aufgenommen. Die aufgenommenen Bereiche sind repräsentativ, da alle EBs der jeweiligen Testreihe ähnlich aussahen.

Neben den morphologischen Unterschieden konnten auch deutliche Größenunterschiede zwischen Embryoid Bodies der Negativkontrolle und den Carbamazepin exponierten Embryoid Bodies festgestellt werden. Letztere waren deutlich kleiner.



Abbildung 24: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepin (Tag 3, Tag 7).



Abbildung 25: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepin (Tag 10,Tag 14).



Abbildung 26: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepin (Tag 17,Tag 21).



Abbildung 27: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepin (Tag 24, Tag 28).

Nachweis von neuralen Markern mittels Western Blot mit Carbamazepin (CBZ)

Für die Western Blot Untersuchungen wurden Proteinbestimmungen mit dem Bradford-Assay durchgeführt. Es wurden 20 µg Protein pro Geltasche aufgetragen. Der Nachweis erfolgte über spezifische Primärantikörper und entsprechende Sekundärantikörper mit Fluoreszenz im Nahinfrarotbereich.

Der Transkritpionsfaktor Pax 6 ist essentiell für die Aufrechterhaltung neuraler Stammzellen und an der Regulation der embryonalen und adulten Neurogenese beteiligt (Thakurela et al. 2016). Das Protein konnte in der Negativkontrolle von Tag 7 der Differenzierung bis Tag 21 detektiert werden mit einem Maximum an Tag 14. Unter Carbamazepineinfluss trat keine erhöhte Proteinmenge an Tag 14 auf, Pax 6 wurde jedoch länger bis Tag 28 gebildet.

GFAP ist ein Marker für Astrozyten, wenn auch nicht alle Astrozyten GFAP positiv sind (Kuegler et al., 2012). GFAP konnte in der Negativkontrolle ab Tag 10 nachgewiesen werden, trat in der mit Carbamazepin behandelten Probe jedoch erst ab Tag 14 auf.



Nestin

Abbildung 28: Nachweis der Marker Pax6, GFAP und Nestin während der neuralen Differenzierung mit und ohne CBZ.

Nestin ist ein Marker für neurale Vorläuferzellen, die schon in der frühen Differenzierungsphase auftreten. In den embryonalen Stammzellen ist Nestin nicht zu finden. Die Abbildung 28 zeigt Western Bot-Ergebnisse mit und ohne Carbamazepin-Einfluss im Verlaufe der neuralen Differenzierung (Z = Tag 0; Tag 3 - 28) der D3-Zellen.

Wirkung von Carbamazepin auf die neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus.

Die morphologischen Untersuchungen der sich differenzierenden Embryoid Bodies zeigten eine deutliche Wirkung von Carbamazepin (42 μ M) auf die neurale Entwicklung. Die behandelten EBs wiesen eine signifikant geringere Größe auf und bildeten weniger neuronale Strukturen aus. Die verwendete Konzentration liegt im therapeutischen Bereich des Medikaments (25-50 μ M). Im EST zeigte diese Konzentration keine zytotoxische Wirkung. Al-Rubai et al. (2017) fanden ebenfalls eine reduzierte Größe von Neurosphären aus humanen neuralen Stammzellen unter Einwirkung von Carbamazepin (ab 100 μ M). Sie erklärten diese Größenreduktion bei nicht toxischen Konzentrationen mit der Eigenschaft von Carbamazepin Neurotransmitter zu modulieren. Die Modulation von Neurotransmittern kann kritisch für die Entwicklung des zentralen Nervensystems sein, denn Neurotransmitter regulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung von neuralen Stammzellen (Nguyen et al, 2001).

3.1.2.3.2 Neurale Differenzierung (erweiterter EST) mit Nonylphenol

Die neurale Differenzierung der embryonalen Stammzellen erfolgte unter Einfluss von drei Konzentrationen Nonylphenol (NP; 0,125 mg/L; 0,25 mg/L; 0,5 mg/L). Insgesamt wurden 3 Experimente mit Nonylphenol über 28 Tage durchgeführt. Die Probenahmen erfolgten an den Tagen 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 und 28. An diesen Tagen fand auch direkt die Extraktion der Proteine und m-RNA statt.

Die morphologischen Untersuchungen wurden parallel durchgeführt. Das Zählen der aus den EBs wachsenden Nervensträngen erfolgte an ebenfalls an Tagen der Probenahme sowie einmal mit einer erhöhten Anzahl von ausgewerteten EBs an Tag 11 und 14.

Die Ergebnisse wurden aus den Arbeiten von Mews (2018), Kuhn (2018), Schütz (2019) und Laubenstein (2019) zusammengestellt.

Anzahl der Neuronenstränge pro Embryoid Body

Die Anzahl der aus den EBs wachsenden Nervenstränge variierte zwischen den EBs derselben Platte stark, weshalb sehr viele EBs (mindestens 30) für diese Auswertungen untersucht werden mussten.



Abbildung 29: Zählbare aus den Embryoid Bodies auswachsende Neuronenstränge.

Die Abbildung 30 zeigt deutlich, dass mit steigender Nonylphenolkonzentration die Anzahl der Nervenstränge pro EB, die aus den EBs auswachsen steigt.



Abbildung 30: Anzahl, der aus den EBs auswachsenden Neuronenstränge unter Einfluss von Nonylphenol (Tag11).



Abbildung 31: Vergleich der Anzahl der Neuronenstränge von Negativkontrolle und 0,5 mg/L NP an Tag 11 und Tag 14.

Mit zunehmender Differenzierungsdauer nehmen die Nervenstränge pro EB sowohl in der Negativkontrolle als auch im Testansatz mit 0,5 mg Nonylphenol/L zu (Abb. 31).

Diese Untersuchungen sind jedoch sehr aufwendig, da aufgrund der hohen Variation sehr viele EBs untersucht werden müssen. Abbildung 32 zeigt Ergebnisse aus der Arbeit von Laubenstein (2019) mit einer geringeren Anzahl von ausgewerteten EBs (30 EBs/Konzentration). Auch hier nimmt mit steigender Konzentration Nonylphenol die Anzahl der Nervenstränge pro EB zu, die Ergebnisse streuen jedoch deutlich stärker.



Abbildung 32: Anzahl der Neuronenstränge unter Einfluss von verschiedenen NP-Konzentrationen

Ab Tag 21 konnten die Zählungen für die NP-Konzentrationen 1,135 μ M (0,25 mg/L) und 2,27 μ M (0,5 mg/L) nicht mehr vorgenommen werden. Die hohe Zahl und Dichte der Stränge ließ hier keine verwendbaren Werte mehr zu.

Erfassung der neuralen Marker mittel RT-PCR

Für die Extraktion der Proteine und der m-RNA wurde das Qiagen All-Prep-Kit verwendet, das die Isolation von DNA, m-RNA und Proteinen aus der gleichen Probe ermöglicht. Nicht alle untersuchten Marker wurden in jedem Differenzierungsversuch nachgewiesen. Zeigte ein Marker in der Substanztestung der ersten Differenzierung keinen Unterschied in der Expression zu der Negativkontrolle, wurde er in den folgenden Untersuchungen durch einen anderen Marker ersetzt.



Abbildung 33: Expression von GFAP während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.

Der Astrozytenmarker GFAP wurde in der Nonylphenol (NP) behandelten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle verzögert exprimiert. Der Marker stieg in der Negativkontrolle von Tag 10 bis Tag 17 an und blieb bis Tag 28 auf gleichbleibendem Niveau. Unter Einfluss von Nonylphenol trat die m-RNA von GFAP erst ab Tag 14 gegenüber der Kontrolle erniedrigt auf und erreichte an Tag 17 das Kontrollniveau.

Der Marker Olig2 ist wie unter Punkt II.1.1 AP2 dargestellt ein Marker für Oligodendrozyten und Glia-Vorläuferzellen und wird ähnlich wie GFAP in der NP-behandelten Differenzierung verzögert exprimiert. Beide Marker sind für Gliazellen spezifisch und werden unter Einfluss von Nonylphenol zu Beginn der Differenzierung später und zu Beginn auf niedrigerem Niveau gebildet als in der Negativkontrolle. Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass Nonylphenol die Bildung von Gliazellen verzögert.



Abbildung 34: Expression von Olig2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.

Der Transkriptionsfaktor Neurog2 tritt in neuralen Vorläuferzellen auf und wurde zu Beginn der Differenzierung an Tag 3 und 7 unter Einwirkung von Nonylphenol geringer exprimiert.



Abbildung 35: Expression von Neurog2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.

Die m-RNA der Glutamatdecarboxilase GAD2 wurde ähnlich wie GFAP und Olig2 verzögert gebildet.



Abbildung 36: Expression von GAD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.

Auch die m-RNA des Glutamattransporters VGlut wies zu Beginn der Differenzierung in den behandelten EBs eine geringere Expression auf.



Abbildung 37: Expression von VGlut während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.



Abbildung 38: Expression von sonic hedgehog (shh) während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.

Der Marker Sonic Hedgehog, der für die Strukturierung des frühen Embryos und des Neuralrohrs verantwortlich ist, wurde in der Negativkontrolle und den Behandelten EBs während der gesamten Differenzierung in gleichem Maße gebildet.

Weitere untersuchte Marker, die unter Einwirkung von Nonylphenol keine Expressionsunterschiede zur Negativkontrolle auf RNA-Ebene zeigten, waren: Thyrosinhydroxylase, Pax 6, Synaptophysin, Myelin basic Protein, Östrogenrezeptor β, Vimentin, β-III-Tubulin, Sox-5, Sox-11, IGF-1, OTX2, Notch, MAPT, NeuroD2, Synca

Erfassung von neuralen Markern mittels Western Blot

Mit dem Western Blot wurden aufgrund des deutlich höheren Aufwands nur einige wenige neurale Marker untersucht (Laubenstein 2019, Kuhn 2018).

Der Astrozytenmarker GFAP, dessen m-RNA in der Differenzierung mit Nonylphenol verzögert auftrat, zeigte auf Proteinebene noch einen stärkeren Effekt durch Nonylphenol. Das Protein GFAP konnte mit dem Western Blot erst ab Tag 14 nachgewiesen werden, die m-RNA trat schon ab Tag 10 der Differenzierung auf. Dieser Unterschied kann auf der geringeren Sensitivität im Nachweis des Proteins beruhen. Im Western Blot wies die Negativkontrolle bis Tag 24 höhere Werte von GFAP auf als die behandelten Proben. Diese Ergebnisse auf Proteinebene weisen auf eine verzögerte Bildung von Astrozyten hin, was auch durch die Ergebnisse der RT-PCR unterstützt wird.



Abbildung 39: Semiquantitativer Nachweis des Markes GFAP während der neuralen Differenzierung mittels Western Blot.



Abbildung 40: : Semiquantitativer Nachweis des Markes Pax6 während der neuralen Differenzierung mittels Western Blot.

Der Nachweis von Pax 6 während der neuralen Differenzierung mittels Western Blot zeigte variierende Ergebnisse zwischen der Negativkontrolle und den niedrigen Konzentrationen Nonylphenol. Der Marker Pax 6 wurde nur bei zwei Differenzierungen nachgewiesen. Mehrere Konzentrationen wurden jedoch nur in einer Differenzierung eingesetzt, weshalb die niedrigeren Konzentrationen Nonylphenol nur bedingt zur Beurteilung herangezogen werden können. In beiden Differenzierungen war eine Tendenz zu niedrigeren Pax 6-Werten in der höchsten Konzentration Nonylphenol.



Abbildung 41: Pax6 während der Differenzierung mit und ohne Einwirkung von Nonylphenol.

Der Neuronenmarker ß-III-Tubulin zeigte von Tag 10 bis Tag 14 der Differenzierung eine größere Expression in der höchsten Konzentration Nonylphenol als in der Negativkontrolle und den geringeren Konzentrationen NP. Die Werte der behandelten Proben waren bis auf Tag 7 und 17 höher als die der Negativkontrolle. Insgesamt stieg der Marker in der höchsten Konzentration Nonylphenol etwas steiler an als in der Negativkontrolle und fiel mit fortschreitender Differenzierung langsamer ab.



Abbildung 42: Semiquantitativer Nachweis von ß-III-Tubulin während der neuralen Differenzierung mittels Western Blot.

Zusammenfassung der Wirkung von Nonylphenol auf die neurale Differenzierung

Die Wirkung von Nonylphenol auf die neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus wurde anhand von morphologischen Auswertungen sowie mittels Bestimmung von neuralen Markern auf mRNA-Ebene via RT-PCR und auf Proteinebene via Western Blot ermittelt. Die eingesetzten Konzentrationen von Nonylphenol lagen im nicht toxischen Bereich (siehe Ergebnisse EST). Die morphologische Auswertung zeigte eine erhöhte Bildung von Neuronensträngen in der höchsten Konzentration gegenüber der Negativkontrolle. Der Neuronenmarker
ß-III-Tubulin war in den Untersuchungen der m-RNA-Level nicht gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Western Blot-Untersuchungen wiesen einen erhöhten ß-III-Tubulin Wert an den Tagen 10-14 in der höchsten Konzentration NP auf. Die Zählung der Neuronenstränge pro EB erfolgte bis maximal Tag 17 der Differenzierung, da mit fortschreitender Differenzierung die einzelnen Stränge nicht mehr zu unterscheiden waren. Einige neurale Marker traten auf mRNA-Ebene in den behandelten Proben verzögert auf. Dabei handelte es sich um die Marker Neurog2, GAD2, Vglut und die für Gliazellen typischen Marker GFAP und Olig2. Auf Proteinebene war die Verzögerung im Auftreten bei dem Astrozytenmarker GFAP sogar drastisch. Von Tag 14 bis Tag 24 wurden in der Negativkontrolle deutlich höhere GFAP-Konzentrationen nachgewiesen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der neuralen Differenzierung unter Einwirkung von Nonylphenol eine verstärkte Differenzierung hin zu Neuronen und eine verzögerte Bildung von Gliazellen, die jedoch zeitlich begrenzt zu sein scheint. Eine ähnliche Wirkung wies auch 17β-Östradiol in einigen Studien auf. Bei einer Behandlung von embryonalen Stammzellen mit zeigten sich eine Erhöhung der Anzahl ausdifferenzierter Neuronen, ein verbessertes Wachstum und eine stärkere Verästelung. Auch einen verbesserten Schutz vor Apoptose und eine erhöhte Rate von Neuronen zu Gliazellen durch verbesserte Proliferation von embryonalen neuralen Stammzellen wurden berichtet (Murashov et al. 2004, Ray et al. 2008). Zhang et al. wiesen 2019 nach, dass durch die Behandlung mit 17-β-Östradiol (10 nM) für 7 Tage in neuralen Stammzellen die Bildung von Neuronen induziert wurde, während die Differenzierung zu Gliazellen inhibiert wurde. Die Resultate von Zhang et al. legen nahe, dass die Wirkung von Nonylphenol auch auf einem östrogenen Wirkungsmechanismus beruhen.

3.1.2.3.3 Neurale Differenzierung (erweiterter EST) mit Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) ist die in den letzten 20 Jahren am meisten untersuchte Substanz der Endokrinen Disruptoren (EDs). BPA wird in großen Mengen hergestellt und kommt in vielen Produkten vor. Bisphenol A ist wie Nonylphenol eine östrogen wirkende Substanz, die auch im Verdacht steht ein neuroentwicklungstoxisches Potenzial zu haben (Grohs et al., 2019). Bisphenol A ist aufgrund seiner östrogenen Wirkung – bindet an die Östrogenrezeptoren α und β - als endokriner Disruptor eingestuft, bindet jedoch auch an Schilddrüsenhormonrezeptoren als Antagonist und kann die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone beeinflussen (Moryama et al, 2002; Zoeller et al., 2005; Kim and Park, 2019). Die Substanz bindet noch an andere Rezeptoren wie z.B. einigen Orphan-Rezeptoren und den AH-Rezeptor (Aryl-Hydrocarbon-Receptor). Aufgrund der vielen Mechanismen, die durch BPA beeinflusst werden, ist eine toxikologische Bewertung der Substanz schwierig (Matsushima et al., 2008; Krüger et al., 2008).

Mit der Substanz Bisphenol A wurden zwei neurale Differenzierungen mit den embryonalen Stammzellen der Maus über 28 Tage durchgeführt.

Anzahl der Nervenstränge pro Embryoid Body – Bisphenol A (BPA)

Wie unter Punkt II.1.2.2 dargestellt wurden die aus dem EBs auswachsenden Neuronenstränge pro EB gezählt. Es wurden jedoch in diesen Experimenten nur 20 EBs je Konzentration ausgezählt, so dass die Streuungen in diesen Versuchen deutlich höher sind. Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der Zählungen. Es ist eine Tendenz zu einer Konzentrations-abhängigen Zunahme der Neuronenstränge pro EB zu sehen. Die Zunahme der Neuronenstränge infolge der Bisphenol A Exposition ist jedoch nicht so eindeutig ausgeprägt wie unter Einwirkung von Nonylphenol. Die Varianz der Ergebnisse ist groß.



Abbildung 43: Anzahl der Neuronenstränge unter Einfluss von verschiedenen Bisphenol A-Konzentrationen

Nachweis von neuralen Markern mittel RT-PCR

Die Untersuchungen von verschiedenen neuralen Markern auf RNA-Ebene mittels RT-PCR zeigten keine Unterschiede in der Expression bei Konzentrationen von bis zu 10 μ M BPA. Chen und Kollegen fanden 2013 durch RT-PCR-Untersuchungen mit spezifischen Markern wie z.B. Nestin, dass die Behandlung von embryonalen Stammzellen der Maus mit BPA (ab 25 μ M) zu einer Verschiebung der Differenzierung hin zu endodermalen und mesodermalen Zellen hin bewirkt und die Differenzierung zu ektodermalen (neuralen) Zellen reduziert.

Der Marker ß-III-Tubulin zeigte auf m-RNA-Ebene während der neuralen Differenzierung kaum Unterschiede in der Expression. Nur an Tag 24 und 28 war die Expression dieses Neuronenmarkers in den behandelten EBs geringer.



Abbildung 44: Expression von
ß-III-Tubulin während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.

Der neurale Marker Pax 6 zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen BPA-behandelten und unbehandelten EBs.



Abbildung 45: Expression von Pax6 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 46: Expression von GFAP während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.

Im Unterschied zu Nonylphenol wirkte sich BPA nicht auf die Expression des Astrozytenmarkers GFAP während der neuralen Differenzierung aus. Auch die Marker Olig2, VGlut, Tyrosinhydroxylase (TH), GAD2, NeuroD2, IGF-1 und Sox-5 zeigten keine Änderung in der Expression.



Abbildung 47: Expression von Olig2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 48: Expression von VGlut während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 49: Expression der Tyrosinhydroxilase während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 50: Expression von GAD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 51: Expression von NeuroD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 52: Expression von IGF-1 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.



Abbildung 53: Expression von Sox5 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol A.

Auf mRNA-Ebene zeigte BPA in Konzentrationen bis zu 10 μ M keine Effekte während der neuralen Differenzierung.

Nachweis von neuralen Markern mittels Western Blot

Auf Proteinebene wurden 4 Marker während der neuralen Differenzierung mit und ohne BPA Einwirkung untersucht. Dies waren die Marker GFAP, ß-III-Tubulin, Pax 6 und Neurog2. Die Ergebnisse der wichtigsten Marker sind in den Abbildungen 54 und 55 dargestellt. Insgesamt sind bei diesen zwei Differenzierungen die Streuungen der Ergebnisse mit dem Western Blot groß.



Abbildung 54: Semiquantitativer Nachweis des Proteins ß-III-Tubulin während der neuralen Differenzierung +/- BPA.

Der Neuronenmarker β -III-Tubulin trat wie zu erwarten in der Negativkontrolle erst ab Tag 7 der Differenzierung auf. In den behandelten EBs war der Marker auch schon in geringen Mengen früher nachweisbar. Trotz der großen Streuung der Ergebnisse lässt sich von Tag 0 bis Tag 7 eine Tendenz zur früheren Bildung von β -III-Tubulin mit steigender BPA-Konzentration erkennen.

Der Astrozytenmarker GFAP trat mit BPA verzögert auf, bis auf die Konzentration 1 μ M. Bei dieser Konzentration waren die Werte von GFAP höher als in der Negativkontrolle.



Abbildung 55: Semiquantitativer Nachweis des Proteins GFAP während der neuralen Differenzierung +/- BPA.

Die Marker Pax 6 und Neurog2 zeigten keine BPA bedingten Effekte während der neuralen Differenzierung.

Zusammenfassung der Wirkung von Bisphenol A auf die neurale Differenzierung

Bisphenol A zeigte keine eindeutige Wirkung auf die neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus. Die morphologischen Untersuchungen zeigten trotz der großen Streuungen eine Tendenz zu mehr aus den EBs auswachsenden Neuronen-oder Neuritensträngen mit steigender BPA-Konzentration. Auf m-RNA-Ebene konnte keine Wirkung von BPA auf die untersuchten neuralen Marker festgestellt werden. Auch der Neuronenmarker
ß-III-Tubulin zeigte – wie auch bei den Nonylphenol-Experimenten - keine erhöhte Expression infolge der Exposition mit BPA. Die Western Blot Ergebnisse wiesen ähnlich wie die morphologischen Untersuchungen auf eine vermehrte Bildung von Neuronen unter BPA-Einfluss hin. Die Ergebnisse der Differenzierungen mit und ohne BPA streuten deutlich stärker als die Ergebnisse der Nonylphenol-Experimente, weisen jedoch ebenfalls auf eine Verschiebung der Differenzierung zu Neuronen hin. Mit BPA wurde aus zeitlichen Gründen eine Differenzierung weniger durchgeführt. Die geringere Datenmenge sowie die geringere östrogene Potenz könnten für diesen weniger deutlichen Effekt verantwortlich sein. Allerdings konnten Tiwari et al. (2014) in in-vivo und in in-vitro-Experimenten an (primären) neuralen Stammzellen (NSC) von Ratten zeigen, dass BPA in Konzentrationen von 4 bis 400 µg pro kg die Proliferation von NSC aus dem Hippocampus reduziert und damit auch die Differenzierung hemmt. In vivo erfolgte die BPA Behandlung prä- und postnatal. Kim und Kollegen veröffentlichten (2009) eine Studie in der niedrige Konzentrationen BPA die Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen der Maus zu einem Neuronen-Phänotyp stimulierten, während hohe Konzentrationen zytotoxisch wirkten, die Proliferation also gehemmt wurde. In diesem Forschungsvorhaben wurden niedrige BPA Konzentrationen (maximal 10 µM) verwendet. Diese niedrigen Konzentrationen haben ein signifikantes östrogenes Potenzial (eigene Daten, Coldham et al., 1997; Lee et al., 2014).

3.1.2.4 Untersuchungen auf Neurotoxizität mit neuralen Stammzellen des Menschen

Für die Untersuchungen auf Neurotoxizität an neuralen Stammzellen wurden die Zelllinie ReNCell VM der Fa. Merck/Millipore verwendet. Diese Zellen entstammen aus dem ventralen Mittelhirn eines 10 Wochen altem Fötus (Corteling & Miljan, 2008). Zur Stabilisierung des Karyo- und Phänotyps wurden die ReNcell VM mit dem v-myc Onkogen immortalisiert. So können weit über 45 Passagen erreicht werden ohne dass sich die Zellen spontan differenzieren (Donato et al., 2007). ReNcell sind multipotent, besitzen die stammzelltypische Eigenschaft der Selbsterneuerung und sind Nestin-positiv (Donato et al., 2007).



Abbildung 56: Vereinfachte Darstellung der neuralen Differenzierung (modifiziert nach Tang et al., 2017)

Die Immortalisierung ermöglicht eine Kultivierung der ReNcell auf dem Basallamina Protein Laminin als Monolayerkultur mit serumfreiem Medium und den Wachstumsfaktoren EGF und FGF. Durch Entzug der Wachstumsfaktoren kommt es innerhalb von vier Tagen wie in Abbildung 57 dargestellt, zur Differenzierung in Astrozyten, Neuronen und Oligo-dendrozyten (Corteling & Miljan, 2008; Donato et al., 2007).

Abbildung 57 zeigt die neuralen Stammzellen in unterschiedlichen Differenzierungsphasen.



C: Tag 7 der Differenzierung D: Tag 14 der Differenzierung Abbildung 57: Humane neurale Stammzellen in verschiedenen Phasen der Differenzierung.



Abbildung 58: ReNCells nach 14 Tagen Differenzierung (Immunfärbung von GFAP-rot, Kernfärbung mit DAPI)

3.1.2.4.1 Nachweis von Zytotoxizität an neuralen Stammzellen

Für den Nachweis von zytotoxischen Effekten in den neuralen, humanen Stammzellen (ReNCells VM) wurde der MTT-Test verwendet. Der MTT-Test musste zunächst auf diesen Zelltyp adaptiert werden. Es wurden Untersuchungen zur optimalen Zelleinsaat durchgeführt und die Testdauer (5-10 Tage) variiert. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden aus dem Forschungsbericht und der Bachelorarbeit von Nadine Duschek (2020, HDA) sowie von Waldmann 2021 zusammengefasst. Nach 5 Tagen Exposition mit Nonylphenol wurde eine IC₅₀ von 1,57 μ M (0,35 mg/L) nachgewiesen, nach 10 Tagen Exposition lag die IC₅₀ bei 0,756 μ M (0,17 mg/L). Abbildung 59 zeigt die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen.



Abbildung 59: MTT-Test mit ReNCells nach 5 (A) und 10 Tagen (B) Exposition mit Nonylphenol.



MTT Assay drei Tage nach Zugabe von NP. A) DMSO; B) Kontrolle; C) 0,142 μ M (3.13x10-2 mg/l) NP; D) 0,284 μ M (6,25x10-2 mg/l) NP; E) 0,567 μ M (0,125 mg/l) NP; F) 1,14 μ M (0,250 mg/l) NP.



Die Ergebnisse der Differenzierungs-Versuche mit Nonylphenol an embryonalen Stammzellen der Maus wiesen auf eine durch das östrogene Potenzial der Substanz ausgelöste Wirkung auf die Differenzierung hin. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob der stark zytotoxische Effekt von Nonylphenol auf die humanen, neuralen Stammzellen über den Östrogenrezeptor vermittelt wird. Der MTT-Test wurde parallel mit Nonylphenol und zwei verschiedenen Konzentrationen des antiöstrogenen, den Östrogenrezeptor hemmenden Stoffes Endoxifen getestet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 61 dargestellt. Endotoxifen hat die Toxizität von Nonylphenol nicht herabgesetzt, sondern Konzentrations-abhängig verstärkt.



Abbildung 61: Wirkung von Nonylphenol auf ReNCells mit und ohne Hemmung des Östrogenrezeptors durch Endoxifen.

Bisphenol A wies im MTT-Test auch eine Konzentrations-abhängige Proliferationshemmung auf. Die IC₅₀ lag bei 20,03 μ M (4,58 mg/L). Tiwari et al. (2015) fanden ebenfalls eine verminderte Vitalität von neuralen Stammzellen der Ratte mit dem MTT-Test ab einer Konzentration von 100 μ M Bisphenol A. Die Testdauer betrug jedoch nur 24 h, eine deutlich geringere Expositionszeit als in dieser Studie.



Abbildung 62: Wirkung von Bisphenol A auf ReNCells im MTT-Test.

Die Substanz 3,4-Dichloraninlin wurde ebenfalls mit dem MTT-Test mit humanen, neuralen Stammzellen untersucht. Nach zunächst stark streuenden Ergebnisse (Duschek 2020) konnte in weiteren Experimenten eine klare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden. Die IC₅₀ lag bei 8,93 μ M (1,45 mg/L).



Abbildung 63: Wirkung von 3,4-Dichloranilin auf ReNCells im MTT-Test.

Zusammenfassung der Zytotoxizitäts-Untersuchungen

Vergleicht man die IC₅₀-Werte der Testsubstanzen mit IC₅₀-Werten von den embryonalen Mausstammzellen (D3-Zellen) und den embryonalen Fibroblasten (3T3-Zellen) (siehe EST-Tests, Laubenstein 2019; Henzel 2020; Kuhn 2018; Mews 2018), so fällt auf, dass die neuralen Stammzellen (ReNCells) deutlich sensitiver auf die getesteten Substanzen reagieren. Nur bei Bisphenol A liegen Fibroblasten und neurale Stammzellen im gleichen Bereich. Die Expositionszeiten lagen jeweils bei 10 Tagen.

Substanz	IC ₅₀ D3-Zellen	IC ₅₀ 3T3-Zellen	IC ₅₀ ReNCells (mg/L)
	(mg/L)	(mg/L)	
Nonylphenol	3,41	7,16	0,17
Bisphenol A	17,45	6,39	4,58
3,4,Dichloranilin	18,6	3,91	1,45

Tabelle 6: Vergleich der IC50-Werte von D3-Zellen, 3T3-Fibroblasten und ReNCells.

Gegenüber den D3-Zellen sind die ReNCells bei NP um Faktor 20 sensitiver, bei BPA um Faktor 3,8 und bei DCA um Faktor 81. Gegenüber den Fibroblasten ist die IC₅₀ bei NP um Faktor 42 geringer, bei BPA um Faktor 1,5 und bei DCA um Faktor 2,7. Alle drei Substanzen besitzen ein neurotoxisches Potenzial. Nonylphenol, das auch eine starke embryotoxische Wirkung aufweist, zeigt ein besonders hohes neurotoxisches Potenzial.

3.1.2.4.2 Nachweis neuraler Marker in ReNCells mittels RT-PCR unter Einfluss von Nonylphenol

ReNCells differenzieren, wenn auf die Zugabe von den Wachstumsfaktoren EGF (Epidermal Growth Factor) und FGF (Fibroblast Growth Factor) in das Kultivierungsmedium verzichtet wird.

Während der Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Vorläuferzellen, Neuronen und Gliazellen wurden verschiedene Marker mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht. Die Probenahme erfolgte an Tag 0, 1, 2, 4, 7, 10 und 14 der Differenzierung mit und ohne Einwirkung von Nonylphenol.

Die Marker, die nachgewiesen wurden, waren GFAP, ß-III-Tubulin, Nestin, Sox2, Synaptophysin, Olig2, Tyrosinhydroxylase, MAP2, PLP1 und der Astrozytenmarker S100ß.

Das Protein, das von dem PLP1-Gen (Proteolipid Protein 1) kodiert wird, ist ein Hauptbestandteil der Myelinschicht im zentralen Nervensystem (Regis et al., 2009; Grossi et al., 2011). Bei MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) handelt es sich um einen Neuronenmarker, der vor allen in Dendriten vorkommt (Hirokawa & Takemura, 2013).

Nonylphenol zeigte keine deutliche stimulierende oder inhibierende Wirkung auf die Expression der getesteten Marker. GFAP wurde ab Tag 2 gleichmäßig exprimiert. Bei ß-III-Tubulin und PLP1 waren in den niedrigeren Konzentrationen NP etwas höhere Werte an Tag 2 als in der Negativkontrolle festzustellen. Dieser Trend setzte sich jedoch nicht fort. Es sind nicht die Ergebnisse von allen neuralen Markern graphisch dargestellt, da keine Effekte zu sehen waren und manche Marker auch nur gering exprimiert wurden.



Abbildung 64: Expression von GFAP in ReNCells während der Differenzierung unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 65: Expression von
ß-III-Tubulin während der Differenzierung unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 66: Expression von Synaptophysin während der Differenzierung unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 67: Expression von PLP1 während der Differenzierung unter Einfluss von Nonylphenol.

Kurzzeitversuche mit proliferierenden neuralen Stammzellen

In weiteren Experimenten mit proliferierenden, nicht differenzierenden ReNCells wurden über 48 h neurale Marker mittels RT-PCR untersucht. Die Expression der Marker ß-III-Tubulin, GFAP, Olig2, Synaptophysin, S100ß, TH, PLP1 und MAP2 wurden nachgewiesen. Die Expression der getesteten neuralen Marker war erwartungsgemäß niedrig, da viele dieser Marker in den neuralen Stammzellen nicht oder nur gering exprimiert werden. Die Ergebnisse weisen in den ersten 24 h Exposition eher auf eine Hemmung der Expression von neuralen Markern wie GFAP und ß-III-Tubulin hin, nach 48 Stunden zeigt sich bei mit Ausnahme von MAP2, dass die Expression der neuralen Marker in der höchsten NP-Konzentration steigt. Dieser Effekt deutet daraufhin, dass Nonylphenol möglicherweise die Differenzierung der NSC induziert. Für eine klare Bewertung müssten diese Untersuchungen über einen längeren Zeitraum wiederholt werden.



Abbildung 68: Expression von ß-III-Tubulin in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 69: Expression von GFAP in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 70: Expression von Olig2 in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 71: Expression von Synaptophysin in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 72: Expression von PLP1 in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.



Abbildung 73: Expression von S100ß in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.

3.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Position 0812: 229.500,90 €

Die komplexen Untersuchungen vor allem der neuralen Differenzierung erforderte die Leitung und Durchführung des Projektes durch einen Vollzeit Wissenschaftler.

Position 0822: 9695,77 €

Die Master- und Bachelor-Studierende mussten während der Differenzierungsstudien auch Arbeiten am Wochenende durchführen.

Position 0843: 21.905,80 €

Die geplanten Ausgaben für Verbrauchsmaterialien waren zu gering geplant, da Coronabedingte Pausen im Laborbetrieb dafür sorgten, dass z.B. die Haltbarkeit von Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF oder Serum-freien Medium nicht mehr gegeben war und Reste verworfen werden mussten.

Position 0846: 350,60 €

Die Ausgaben für Dienstreisen konnten niedrig gehalten werden, da die Hochschule selbst Verbundtreffen organisiert hat und Corona-bedingt nicht alle Treffen sowie Tagungen stattfinden konnten.

3.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie unter den Punkten 1. und 2. aufgeschlüsselt, wurden die Arbeiten und die finanziellen Mittel entsprechend der Arbeitspakete und an den im Verlauf des Projektes erhaltenen Ergebnisse ausgerichtet. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass mit dem MTT-Test mit immortalisierten, humanen, neuralen Stammzellen ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis von Neurotoxizität zur Verfügung steht. Auch mit dem erweiterten EST, der neuralen Differenzierung, konnten relevante Effekte von Nonylphenol auf die neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus gefunden werden, die der Wirkung von Östradiol entsprechen und somit auf einen östrogenen Wirkungsmechanismus hindeuten.

3.4 Darstellung des voraussichtlichen Nutzens

Auf der Basis der durchgeführten Untersuchungen kann festgehalten werden, dass mit den immortalisierten, humanen, neuralen Stammzellen (ReNCells VM), Stammzellen für Toxizitätsuntersuchungen zur Verfügung stehen, die über 45 Passagen hin verwendbar sind und serumfrei kultiviert werden können. Diese Zellen können zu Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert werden, so dass sowohl neurotoxische als auch neuro-entwicklungstoxische Effekte in vitro nachgewiesen werden können. In diesem Forschungsvorhaben wurde der MTT-Test auf die ReNCells adaptiert, es können jedoch auch andere toxikologische Methoden mit verschiedenen Endpunkten auf diese Stammzellen übertragen oder angepasst werden. Mit dem MTT-Test mit ReNCells wurde eine sensitive Methode zum Nachweis von Neurotoxizität entwickelt, die jedoch in weiteren Untersuchungen noch weiter validiert werden sollte.

Die Untersuchungen der neuralen Differenzierung mit embryonalen Maus-Stammzellen zeigten, dass die Expression von Zell-typischen Markern durch Substanzeinwirkung verändert werden kann. Nonylphenol förderte die Bildung von neuronalen Zellen, während die Differenzierung zu Gliazellen gehemmt wurde, was anhand des Astrozytenmarker GFAP und des Neuronenmarkers ß-III-Tubulin nachgewiesen wurde. Diese Untersuchungen wurden bei nicht-toxischen Konzentrationen von NP für die embryonalen Stammzellen durchgeführt. Der erweiterte EST ist eine aufwendige, lang andauernde Methode zum Nachweis von neuro-entwicklungstoxischen Effekten. Mit einer Verkürzung der Testdauer wäre das Verfahren für die Praxis geeigneter. Einzelne neurale Marker, deren Expression infolge östrogen-bedingter neurotoxischer Effekte herauf- oder herab-reguliert werden, konnten identifiziert werden. Als alleinige Endpunkte sind diese Marker jedoch nicht zu verwenden, da die Expression dieser Marker auch über nicht-östrogene Mechanismen moduliert werden kann.

3.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens an anderen Stellen

Auf dem Gebiet der Erfassung von Neurotoxizität in vitro gab es in den letzten Jahren einige Fortschritte. Besonders Elektrophysiologische Ansätze wie Patch Clamp- und Mikro-Elektroden-Array Verfahren (MEA) zur Untersuchung der Elektrophysiologie von neuronalen Netzwerken wurden verbessert und verbreiteter angewendet (Shafer, 2019). Diese Methode erlauben einen höheren Durchsatz in der Substanztestung.

Neuroentwicklungstoxizität wird zurzeit (nur bei hohen Tonnagen) in der Regulative noch in vivo untersucht. Aufgrund der Komplexizität der Gehirnentwicklung kann das in vivo-Verfahren nicht einfach durch eine simple in vitro-Methode mit einem oder zwei Endpunkten ersetzt werden. Daher gibt es viele methodische Ansätze mit vielen verschiedenen Endpunkten, um neuro-entwicklungstoxische Effekte zu erfassen. Dazu gehören molekulare Nachweise von Markern, die für eine normale Gehirnentwicklung notwendig sind, Differenzierungs-Untersuchungen an 2-D und 3-D-Kulturen sowie an embryonalen Stammzellen z.B. mit erweiterten EST-Verfahren mit neuronaler Differenzierung (Hessel et al., 2018). Trotz sehr vieler Ansätze gibt es momentan noch keine Testbatterie für Neuro-Entwicklungs-Toxizität, die die vielen Mechanismen, die an der Gehirnentwicklung beteiligt sind, abbildet.

3.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Masterarbeit von Romy Kuhn: In Vitro-Untersuchungen zur Modulation einer neuralen Differenzierung muriner Stammzellen durch endokrin wirksame Substanzen. (2018)

Masterarbeit von Timo Mews: In Vitro-Untersuchung zur Modulation neuraler Differenzierungsmarker durch endokrin wirksame Substanzen. (2018)

Bachelorarbeit von Ayca Turgut: Untersuchung embryotoxischer Effekte des Antikonvulsivums Carbamazepin und dessen Einfluss auf die neuronale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen. (2018) Masterarbeit Sabine Schütz: In vitro-Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen D3 unter Einfluss der endokrin wirksamen Substanzen Nonylphenol und Bisphenol A. (2019)

Bachelorarbeit Stefan Laubenstein: Nachweis von neuronalen Differenzierungsmarkern unter Einfluss endokrin wirksamer Substanzen mittels Western Blot Analyse (2019)

Masterarbeit Mareike Lang: In vitro-Untersuchung des Einflusses der endokrin wirksamen Substanz Bisphenol A auf die embryonale Gehirnentwicklung anhand muriner, embryonaler Stammzellen und humaner Vorläuferzellen über den Nachweis verschiedener neuronaler Marker. (2019)

Bachelorarbeit von Nadine Duschek: Wirkung von östrogenwirkenden endokrinen Disruptoren auf neurale humane Stammzellen. (2020)

Bachelorarbeit von Nils Henzel: Effekte von Endokrinen Disruptoren auf embryonale Stammzellen. (2020)

Geplant ist eine Publikation der Ergebnisse in einer renommierten, internationalen Fachzeitschrift für Ende 2021.

4. 4. Erfolgskontrollbericht

Siehe Anlage

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Rekombinierten Hefetests	13
Abbildung 2: Östrogene Wirkung von 17.ß-Östradiol im Rekombinierten Hefetest (R-YES)	14
Abbildung 3: Östrogene Wirkung von Bisphenol A im R-YES.	15
Abbildung 4: Östrogene Wirkung von 3,4-Dichloranilin im R-YES	15
Abbildung 5: Östrogene Wirkung von Nonylphenol im R-YES.	16
Abbildung 6: Östrogene Wirkung von Ethinyl-Estradiol im R-YES	16
Abbildung 7: Östrogene Wirkung von 2,4-Dichlorohenol im R-YES.	17
Abbildung 8: Kultivierung von embryonalen Satmmzellen im Hanging Drop-Verfahren, Embryoid	
Bodies	18
Abbildung 9: Nachweis von Cardiomyozyten, die aus embryonalen Stammzellen differenziert wurd	den.
	18
Abbildung 10: Untersuchung von verschiedenen Chargen FBS im EST-Differenzierungsassay	19
Abbildung 11: Nachweis der Pluripotenz der D3-Zellen über die Immunfärbung des	
Pluripotenzmarkers Oct-4.	19
Abbildung 12: Bestimmung der IC ₅₀ von 5-Fluorouracil im MTT-Test mit 3T3-Fibroblasten (N=2)	20
Abbildung 13: Bestimmung der IC ₅₀ von 5-Fluorouracil im MTT-Test mit D3-Zellen (N=3)	20
Abbildung 14: Ergebnisse des Differenzierungsassay mit 5-Fluorouracil mit D3-Zellen (N=3)	21
Abbildung 15: Bestimmung der ID ₅₀ aus den Differenzierungsassays mit 5-Fluorouracil.	21
Abbildung 16: Embryoid Body ohne die Induktion der neuralen Differnzierung durch Retinsäure (T	ag
14, 100x).	24
Abbildung 17: Embryoid Body mit der Induktion der neuralen Differenzierung durch Retinsäure (T	ag
17, 100x).	25
Abbildung 18: Embryoid Body mit auswachsenden Nervensträngen (Tag 17, Vergrößerung 100x)	25
Abbildung 19: Immunzytochemischer Nachweis von GFAP, Nestin und Pax6 neural differenzeirter	D3-
Zellen	26
Abbildung 20: Astrozyten aus D3-Zellen differenziert und durch Immunfärbung von GFAP	
Fluoreszenz-markiert	26
Abbildung 21: Neuronale Zellen, nachgewiesen durch den neuronalen Marker ß-III-Tubulin via	
Immunfärbung	27
Abbildung 22: Ergebnisse von Carbamazepin im MTT-Tests mit D3-Zellen	28
Abbildung 23: Ergebnisse von Carbamazepin im Differenzierungsassay mit D3-Zellen	28
Abbildung 24: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepir	า
(Tag 3,Tag 7)	29
Abbildung 25: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepir	า
(Tag 10,Tag 14).	30
Abbildung 26: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepir	า
(Tag 17,Tag 21).	30
Abbildung 27: Morphologische Unterschiede zwischen Negativkontrolle und 42 µM Carbamazepir	า
(Tag 24,Tag 28)	31
Abbildung 28: Nachweis der Marker Pax6, GFAP und Nestin während der neuralen Differenzierung	g
mit und ohne CBZ.	32
Abbildung 29: Zählbare aus den Embryoid Bodies auswachsende Neuronenstränge	33
Abbildung 30: Anzahl, der aus den EBs auswachsenden Neuronenstränge unter Einfluss von	
Nonylphenol (Tag11).	34
Abbildung 31: Vergleich der Anzahl der Neuronenstränge von Negativkontrolle und 0,5 mg/L NP a	in
Tag 11 und Tag 14.	34
Abbildung 32: Anzahl der Neuronenstränge unter Einfluss von verschiedenen NP-Konzentrationen	າ. 35
Abbildung 33: Expression von GFAP während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP.	35

Abbildung 34: Expression von Olig2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP	. 36
Abbildung 35: Expression von Neurog2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP	. 37
Abbildung 36: Expression von GAD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP	. 37
Abbildung 37: Expression von VGlut während der neuralen Differenzierung mit und ohne NP	. 38
Abbildung 38: Expression von sonic hedgehog (shh) während der neuralen Differenzierung mit und	b
ohne NP	. 38
Abbildung 39: Semiquantitativer Nachweis des Markes GFAP während der neuralen Differenzierur	١g
mittels Western Blot.	. 39
Abbildung 40: : Semiquantitativer Nachweis des Markes Pax6 während der neuralen Differenzierun	ng
mittels Western Blot.	. 40
Abbildung 41: Pax6 während der Differenzierung mit und ohne Einwirkung von Nonylphenol	. 40
Abbildung 42: Semiquantitativer Nachweis von B-III-Tubulin wahrend der neuralen Differenzierung	5
mittels western Blot.	.41
Abbildung 43: Anzahl der Neuronenstränge unter Einfluss von Verschiedenen Bisphenol A-	40
Abbildung 44. Everencien von 8. III. Tubulin während der neurolen Differenzierung mit und ehne	. 42
Abbildung 44: Expression von is-III-Tubulin wahrend der neuralen Differenzierung mit und ohne	12
Abbildung 45: Expression von Pax6 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisnhenol	.45 I A
Abbildung 45. Expression von Paxo wantend der neuralen Differenzierung mit und onne bisphenol	1 A. // 2
Abhildung 46: Expression von GEAP während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bispheno	. 4 5 \ΙΔ
Abbildung 40. Expression von dr Ar wantend der neuralen binerenzierung mit und omne bispitend	μ ΔΔ
Abbildung 47: Expression von Olig2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bispheno	ol A.
	. 44
Abbildung 48: Expression von VGlut während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenc	ol
A	. 44
Abbildung 49: Expression der Tyrosinhydroxilase während der neuralen Differenzierung mit und ol	hne
Bisphenol A	. 45
Abbildung 50: Expression von GAD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphene	ol
A	. 45
Abbildung 51: Expression von NeuroD2 während der neuralen Differenzierung mit und ohne	
Bisphenol A	. 45
Abbildung 52: Expression von IGF-1 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bispheno	ol A.
	. 46
Abbildung 53: Expression von Sox5 während der neuralen Differenzierung mit und ohne Bisphenol	IA.
	. 46
Abbildung 54: Semiquantitativer Nachweis des Proteins &-III-Tubulin während der neuralen	
Differenzierung +/- BPA	.4/
Abbildung 55: Semiquantitativer Nachweis des Proteins GFAP wahrend der neuralen Differenzieru	ng
+/- BPA	.47
Abbildung 56. Vereinfächte Darstending der neuralen Differenzierung (modifiziert nach rang et al.,	<u>،</u>
Abbildung 57: Humane neurale Stammzellen in verschiedenen Phasen der Differenzierung	. 49
Abbildung 58: ReNCells nach 14 Tagen Differenzierung (Immunfärhung von GEAP-rot Kernfärhung	. 43 3
mit DAPI)	, 50
Abbildung 59: MTT-Test mit ReNCells nach 5 (A) und 10 Tagen (B) Exposition mit Nonvinhenol	. 50
Abbildung 60: Mikroskopische Bilder der ReNCells nach 3 Tagen Nonvlohenol-Exposition	. 51
Abbildung 61: Wirkung von Nonvlphenol auf ReNCells mit und ohne Hemmung des	
Östrogenrezeptors durch Endoxifen.	. 51
Abbildung 62: Wirkung von Bisphenol A auf ReNCells im MTT-Test.	. 52

Abbildung 63: Wirkung von 3,4-Dichloranilin auf ReNCells im MTT-Test	. 52
Abbildung 64: Expression von GFAP in ReNCells während der Differenzierung unter Einfluss von	
Nonylphenol	. 54
Abbildung 65: Expression von ß-III-Tubulin während der Differenzierung unter Einfluss von	
Nonylphenol	. 54
Abbildung 66: Expression von Synaptophysin während der Differenzierung unter Einfluss von	
Nonylphenol	. 54
Abbildung 67: Expression von PLP1 während der Differenzierung unter Einfluss von Nonylphenol	. 55
Abbildung 68: Expression von ß-III-Tubulin in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von	
Nonylphenol	. 55
Abbildung 69: Expression von GFAP in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol	. 55
Abbildung 70: Expression von Olig2 in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol	. 56
Abbildung 71: Expression von Synaptophysin in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von	
Nonylphenol	. 56
Abbildung 72: Expression von PLP1 in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol	. 56
Abbildung 73: Expression von S100ß in proliferierenden ReNCells unter Einfluss von Nonylphenol.	. 56

6. Tabelleverzeichnis

Tabelle 1: Östrogene Wirkung der Testsubstanzen im Rekombinierten Hefetest ohne externe	
metabolische Aktivierung	
Tabelle 2: Lineare Diskriminanzfunktionen des validierten Prädiktionsmodells de	s EST
mit drei Klassifizierungskriterien der Embryotoxizität	21
Tabelle 3: Diskriminanzanalyse von 5-Fluorouracil	22
Tabelle 4: Klassifizierung von 5-Fluorouracil nach dem Prädiktionsmodell	22
Tabelle 5: Ergebnisse des Embryonalen Stammzelltests mit den Testsubstanzen	
Tabelle 6: Vergleich der IC50-Werte von D3-Zellen, 3T3-Fibroblasten und ReNCells	53



Abschlussbericht

		Verbundvorhaben NeuroBox Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf Teilprojekt der Landeswasserversorgung Weiterentwicklung der Wirkungsbezogenen Analytik (WPA)	
		in Kombination mit der Non-Target-Analytik	
Förderk	ennzeichen:	02WRS1419E	
Durchfi	ihrende Institution:	Zweckverband Landeswasserversorgung (LW)	
Projektpartner:		Umweltbundesamt (UBA) - Fachgebiet II 3.6 Universität Heidelberg - Center for Organismal Studies RWTH Aachen - Institut für Umweltforschung - Lehrstuhl für Chemosensorik - Molekulare und systemische Neurophysiologie Hochschule Darmstadt - Fachbereich Chemie- und Biotechnologie Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ - Department Bioanalytische Ökotoxikologie	
Bewilli	gungszeitraum:	01.03.2017 bis 29.02.2020 verlängert bis 31.12.2020	
Projektleitung:		Dr. Wolfgang Schulz	
Datum:		30.06.2021	
*	GEFÖRDERT VOM Bundesministerium für Bildung und Forschung	Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WRS1419E gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.	



Abschlussbericht gemäß Anlage 2 zu Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

Inhaltsverzeichnis

1	Kur	zfassung4
	1.1	Berichtsblatt
2	Kur	ze Darstellung der Rahmenbedingungen6
	2.1	Aufgabenstellung
	2.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
	2.3	Planung und Ablauf des Vorhabens
	2.4	Anknüpfung an den wissenschaftlichen und technischen Stand 10
	2.4.	1 Wirkungsbezogene Analytik mit Dünnschichtchromatographie
	2.4.	2 Non-Target-Screening 11
	2.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen 12
3	Eing	gehende Darstellung der Forschungsergebnisse 12
	3.1	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen
	3.1.	1 Übersicht TP 5 12
	3.1.	2 WBA mit HPTLC-Acetylcholinesterase (Grundlage der Methode) 13
	3.1.	3 Verbesserung der Trennleistung (2-dimensionale Entwicklung) 16
	3.1.	4 Trennung polarer Inhibitoren
	3.1.	5 Steigerung der Empfindlichkeit des Bioassays
	3.1.	6 Entwicklung eines Auswerteverfahrens für den Bioassay
	3.1.	7 Metabolische Aktivierung von indirekt neurotoxisch wirkenden Substanzen
	3.1.	8 Non-Target-Analytik - WBA
	3.1.	9 Wirkungsbezogenes Monitoring potenziell neurotoxischer Effekte in Wasserproben . 34
	3.1.	10 Anwendung der Large Volume Anreicherung (TP 6)
	3.1.	11 Referenzsubstanzen
	3.1.	12 Zusammenfassung Ergebnisse
Neuro 🍟 BoX

3.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	. 47
3.2.1 Personal	. 47
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	. 48
3.2.3 Dienstreisen	. 48
3.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	. 48
3.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebe Verwertungsplans	nen . 49
3.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt geword Fortschritte	lene . 49
3.6 Erfolgte Veröffentlichungen	. 49
4 Danksagung	. 50
5 Literaturverzeichnis	. 51
6 Anhang	. 54
6.1 Methodenbeschreibung Wirkungsbezogene Detektion mit AChE	. 54
6.2 HPTLC-Trennung	. 59
6.2.1 AMD - Fingerprint	. 59
6.2.2 Trennung polare AChE	. 61
6.3 Qualitätssicherung	. 63
6.4 HPLC-HRMS Methode	. 63



1 Kurzfassung

1.1 Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)					
Nicht geplant	Schlussbericht					
3. Titel						
Verbundvorhaben NeuroBox						
Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im						
Wasserkreislauf						
Teilprojekt der Landeswasserve	ersorgung:					
Weiterentwicklung der Wirkung	gsbezogenen Analytik (WBA) in F	Kombination mit der				
Non-Target-Analytik						
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]		5. Abschlussdatum des Vorhabens				
Schulz, Wolfgang		31.12.2020				
		6. Veröffentlichungsdatum				
		-				
		7. Form der Publikation				
		Unveröffentlichter Bericht				
8. Durchführende Institution(en) (Nan	ne, Adresse)	9. Ber. Nr. Durchführende Institu-				
		tion				
Zweckverband Landeswasserverse	orgung	-				
Schützenstraße 4		10. Förderkennzeichen				
70182 Stutigart		02WRS1419E				
		11. Seitenzahl				
12. Fördernde Institution (Name, Adro	esse)	13. Literaturangaben				
		28				
Bundesministerium für		14. Tabellen				
Bildung und Forschung (BMBF)		7				
53170 Bonn		15. Abbildungen				
		39				
16. Zusätzliche Angaben		1				
-						
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)						
-						



18. Kurzfassung

Die Auswirkungen und zunehmenden Risiken unserer modernen Gesellschaft auf die Wasserqualität sind schwer abzuschätzen. Deshalb sehen sich Wasserversorgungsunternehmen mit vielerlei Fragestellungen konfrontiert, um eine dauerhaft hohe Trinkwasserqualität zu gewährleisten. Das Monitoring der Roh- und Trinkwasserqualität ist hierbei ein zentraler Punkt.

Das bisherige Routinemonitoring von Roh- und Trinkwasser basiert auf einem Targetansatz. Die Konzentration ausgewählter Substanzen wird regelmäßig untersucht und entsprechend anhand von festgelegten Maßstäben bewertet. Diese Herangehensweise kann aber nur einen Ausschnitt der möglichen Belastung erfassen. Die Non-Target-Analytik ist heute in der Lage eine Vielzahl an Komponenten zu erfassen ohne diese mit vertretbarem Aufwand mehrheitlich einer chemischen Struktur zuzuordnen. Zur Beurteilung einer möglichen Wirkung der Komponenten ist ein wirkungsbasiertes Monitoring-Konzept erforderlich. In diesem Teilprojekt soll deshalb die Möglichkeit der Wirkungsbezogenen Analytik mittels HPTLC-AChE-Hemmung zur Erkennung von AChE-Inhibitoren bei der Überwachung der Trinkwassergewinnung optimiert werden.

Die begrenzte Trennleistung bzw. Peakkapazität der HPTLC erschwert die Identifizierung der aktiven Substanzen. Durch Entwicklung einer zweidimensionalen wirkungsbasierten Dünnschichtchromatographie konnte die Peakkapazität um den Faktor 6 erhöht werden. Allerdings ist aufgrund des damit verbundenen Aufwands dies nur für entsprechend belastete relevante Proben sinnvoll.

Die große Polaritätsspanne relevanter AChE-Inhibitoren erforderte die Entwicklung einer Trennmethode die sowohl relativ unpolare als auch polare Verbindungen gleichzeitig trennt. Hier wurde die HILIC-Trennung der HPLC auf die HPTLC übertragen. Dies ermöglicht die Detektion u.a. von Antidementiva in Wasserproben deren Verordnungsmenge in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat.

Zur Detektion indirekt wirkender Inhibitoren wurde versucht, die S9-Aktivierung auf die HPTLC-Platte zu übertragen. Eine Aktivierung nach der Trennung war nicht erfolgreich. Eine Aktivierung der Probe vor der Auftragung auf die HPTLC-Platte und anschließender Trennung war nicht für alle Substanzen erfolgreich. Es zeigte sich bei dieser externen S9-Aktivierung, dass Matrixbestandteile insbesondere Huminstoffe die Aktivierung stören. Diese Störung kann durch SPE-Anreicherung der Probe bei pH 7 anstatt bei pH 2 vermieden werden. Dies ist allerdings mit dem Verlust von sauren Verbindungen bei der Anreicherung verbunden. Es konnte im Ansatz gezeigt werden, dass eine Aktivierung nach dem Auftragen der Probe auf die HPTLC-Platte durch Overspotting prinzipiell funktioniert auch bei pH 2 angereicherten Proben.

Anhand eines umfangreichen Untersuchungsprogramms von Kläranlagenablaufwasser, Oberflächenwasser, Rohwasser und Trinkwasser konnte gezeigt werden, dass die HPTLC-AChE-Hemmung einen Informationsgewinn darstellt. Hierbei besteht die entscheidende Information in der Detektion von Wirkung und der Veränderung der Wirkung durch den Prozess beispielsweise auf der Kläranlage oder bei der Trinkwasseraufbereitung.

Durch Kombination mit der HPLC-HRMS konnten einige für die Wirkung verantwortliche Substanzen identifiziert werden. Hierzu gehören die Alkybenzolsulfonate (z. B. Dodecylbenzolsulfonat). Die Hemmung der AChE durch diese Substanzen liegt vermutlich in der Blockierung des Zugangs zum Rezeptor aufgrund der Molekülgröße.

19. Schlagwörter			
Spurenstoffe, AChE, WBA, Non-Target-Screening			
20. Verlag	21. Preis		
-	-		



2 Kurze Darstellung der Rahmenbedingungen

2.1 Aufgabenstellung

Das Verbundforschungsvorhaben NeuroBox Das geplante Verbundvorhaben hat zum Ziel, mittels einer Weiterentwicklung der in "Tox-Box"-Verbund entwickelten Teststrategie anthropogene Spurenstoffe zu erfassen und diese auch hinsichtlich ihrer Neurotoxizität zu bewerten. Dies ist im Hinblick der Zunahme neurodegenerativer Erkrankungen und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung. Durch die Einbeziehung neuer zentraler toxikologischer und die Kombination öko- und humantoxikologischer Endpunkte kann der gesamte Wasserkreislauf berücksichtigt, komplexe Wirkmechanismen identifiziert und sichere gesundheitliche Orientierungswerte abgeleitet werden. Die Arbeitsziele des Vorhabens entsprechen als Anschlussprojekt in der RiSKWa-Fördermaßnahme den förderpolitischen Zielen.

Die Landeswasserversorgung entwickelt in einem Teilprojekt eine Methode, durch welche neuroaktive Substanzen, wie z. B. AChE-hemmende Substanzen, in Roh- und Trinkwasser nachgewiesen und identifiziert werden können. Hierbei soll die wirkungsbezogene Analytik (WBA) in Kombination mit der Non-Target-Analytik eingesetzt werden.

2.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Landeswasserversorgung ist eine der größten und traditionsreichsten Fernwasserversorgungen Deutschlands. Das Unternehmen wurde im Jahr 1912 gegründet, die ersten Anlagen gingen bereits 1917 in Betrieb. Heute steht die Landeswasserversorgung für die zuverlässige und sichere Trinkwasserversorgung von rund 250 Städten und Gemeinden – darunter die Städte Aalen, Ellwangen, Esslingen, Göppingen, Ludwigsburg, Schwäbisch Gmünd, Stuttgart und Ulm – mit einer jährlichen Abgabe von rund 100 Millionen Kubikmetern Trinkwasser.

Das Betriebs- und Forschungslaboratorium der Landeswasserversorgung beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der Problematik von organischen Spurenstoffen in Grund-, Oberflächen- und Trinkwasser und hat eine hohe Kompetenz in der chemischen Spurenstoffanalytik und der Überwachung der Trinkwasseraufbereitung aufzuweisen. Aufgrund der direkten Nutzung von Oberflächenwasser - neben der Nutzung von Grund- und Quellwasser - zur Trinkwassergewinnung im Wasserwerk Langenau sind Kenntnisse über die Belastung mit organischen Spurenstoffen und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung von besonderer Bedeutung.



Zur Überwachung der Roh- und Trinkwässer wird eine breite Palette an analytischen Methoden eingesetzt. Dazu gehört die Gaschromatographie, die Flüssigkeitschromatographie (Säulenund Dünnschichtchromatographie) in Kombination mit verschiedenen Detektoren, insbesondere der Massenspektrometrie. Die Anreicherung von Wasserproben mittels Festphasenextraktion oder Flüssig/Flüssig-Extraktion stellt falls erforderlich die typische Probenvorbereitung dar.

Einen Schwerpunkt bildet die Methodenentwicklung zur Anwendung der Non-Target-Analytik mittels LC-HRMS (Müller et al. 2011). Zur Identifizierung und orientierenden Einschätzung organischer Spurenstoffe wird zusätzlich die Dünnschichtchromatographie (HPTLC) mit wirkungsbezogener Detektion eingesetzt (Schulz et al. 2008).

Die apparative Ausstattung des Betriebs- und Forschungslaboratoriums umfasst:

4 LC-Tandem-Massenspektrometer geeignet für anreicherungsfreie Bestimmungen, davon 3 mit zusätzlicher linearer Ionenfalle; 2 hochauflösende LC-QTOF/MS (LC-HRMS), davon 1 geeignetes für anreicherungsfreie Bestimmungen; 1 HPLC mit Fluoreszenz-Detektion; 5 GC-Systeme mit verschiedenen Detektoren (Quadrupol-MS, Quadrupol-MS/MS); Laborausstattung für z.B. Anreicherung mittels SPE, Flüssig-flüssig-Extraktion; HPTLC/AMD-System bestehend aus Automatisches Auftragesystem ATS4, AMD2- und ADC2-Entwicklungseinheit, TLC-Scanner für UV-Absorption und Fluoreszenzmessung, TLC Visualizer, Derivatizer, Detektionssystem für Biolumineszenzmessung; Nasschemisches Labor; Mikrobiologisches Labor S2.

2.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Verbundforschungsvorhaben NeuroBox - Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf – hat zum Ziel, mittels einer Weiterentwicklung der im "Tox-Box"-Verbund entwickelten Teststrategie anthropogene Spurenstoffe zu erfassen und diese auch hinsichtlich ihrer Neurotoxizität zu bewerten. Dies ist im Hinblick der Zunahme neurodegenerativer Erkrankungen und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung. Durch die Einbeziehung neuer zentraler toxikologischer und die Kombination öko- und humantoxikologischer Endpunkte kann der gesamte Wasserkreislauf berücksichtigt, komplexe Wirkmechanismen identifiziert und sichere gesundheitliche Orientierungswerte abgeleitet werden. Die Arbeitsziele des Vorhabens entsprechen als Anschlussprojekt in der RiSKWa-Fördermaßnahme den förderpolitischen Zielen.



Das Verbundvorhaben setzt sich aus sechs Teilprojekten (TP) zusammen, wobei TP 1 den Verbund koordinieren wird. In TP 1 wird die in "Tox-Box" aufgestellte dreistufige In-vitro-Testbatterie optimiert und weiterentwickelt, indem spezifische Endpunkte für das Nervensystem und neue wissenschaftliche Erkenntnisse zur Kultivierung organspezifischer Zelllinien unter Verwendung von Mikrogliazellen und humanen pluripotenten Stammzellen einbezogen werden. Auch soll der potentielle Übertritt von Chemikalien durch die Blut-Hirn-Schranke anhand von Modelluntersuchungen simuliert werden. Hierdurch ist eine sicherere Bewertung chemischer Verbindungen in Hinblick auf deren Neurotoxizitätspotenzial möglich. TP 2 wird sich mit der Frage der Übertragbarkeit des Fischembryomodells (Embryo des Zebrabärblings) auf Säugetiere (einschließlich Mensch) bezüglich neurotoxischer Effekte, als auch mit der Frage nach der ökotoxikologischen Relevanz (Populationsrelevanz) neurotoxischer Effekte in Fischembryonen befassen. In TP 3 erfolgt eine mechanistische Untersuchung des Zebrabärblingsembryomodells, wodurch neurotoxische Wirkmechanismen aufgeklärt werden können, anhand derer neue Methoden innerhalb des GOW-Konzeptes für die Bestimmung der Neurotoxizität entwickelt werden können. Durch vergleichende Experimente an Fischen und Mäusen sollen neue neurologische und neuropathologische Biomarker im Fischmodell ermittelt und neue wirkungsspezifische, verhaltensbasierte Tests entwickelt werden. Das TP 4 hat mittels Invitro-Charakterisierung zum Ziel, Marker für parallele neuroembryotoxische und endokrine Stoffwirkungen zu identifizieren, wodurch Erkenntnisse zu den zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen aufgedeckt werden können. In TP 5 ist die Entwicklung einer Methode angestrebt, durch welche neuroaktive Substanzen, wie z. B. AChE-hemmende Substanzen, in Roh- und Trinkwasser nachgewiesen und identifiziert werden können. Hierbei soll die wirkungsbezogene Analytik (WBA) in Kombination mit der Non-Target-Analytik eingesetzt werden. TP 6 wird sich mit der Identifizierung und toxikologischen Charakterisierung neuro-aktiver Verbindungen aus wässrigen Umweltproben und von Mischungen unter Berücksichtigung der Mischungseffekte "Konzentrationsadditivität" bzw. "unabhängige Wirkung" beschäftigen, indem sich Methoden der wirkungsorientierten Analytik und der differentiellen Analyse bedient wird und Zebrabärblingsembryonen verwendet werden. Ein weiterer Bestandteil des TP 6 sind Untersuchungen zur Biotransformation neuroaktiver Substanzen im Zebrabärblingsembryo.

Koordination:

Umweltbundesamt, Fachgebiet "Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers",

Dr. Tamara Grummt



Teilprojekt 1:

Methodische Weiterentwicklung der dreistufigen In-vitro-Testbatterie zur Erfassung neurotoxischer Wirkungen und Koordination des Verbundes Dr. Tamara Grummt, Jochen Kuckelkorn Umweltbundesamt

Teilprojekt 2:

Neurotoxizität bei Fischen: Bedeutung für Mensch und Umwelt Prof. Dr. Thomas Braunbeck Aquatische Ökologie und Toxikologie, Center for Organismal Studies Universität Heidelberg

Teilprojekt 3:

Identifikation von neurotoxischen Wirkungsmechanismen (in vivo) zur Entwicklung neuer wirkungsspezifischer Testfahren Prof. Dr. Henner Hollert Institut für Umweltforschung der RWTH Aachen Universität

RWTH Aachen Universität, Lehrstuhl für Chemosensorik Prof. Dr. Marc Spehr

RWTH Aachen Universität, Lehr- und Forschungsgebiet Molekulare und systemische Neurophysiologie Prof. Dr. Björn Kampa

Teilprojekt 4:

In-vitro-Charakterisierung paralleler neuroembryotoxischer und endokriner Stoffwirkungen zur Identifikation diskriminierender Biomarker Prof. Dr. Dieter Pollet, Dr. Petra Waldmann Hochschule Darmstadt, Fachbereich Chemie- und Biotechnologie, Fachgebiet Zellbiologie

Teilprojekt 5:

Weiterentwicklung der wirkungsbezogenen Analytik (WBA) in Kombination mit der Non-Target-Analytik zum Nachweis und zur Identifizierung neuroaktiver Substanzen in Roh- und Trinkwasser – TP Monitoring-1 Dr. Wolfgang Schulz

Betriebs- und Forschungslaboratorium, Zweckverband Landeswasserversorgung (LW)



Teilprojekt 6:

Identifizierung und toxikologische Charakterisierung neuroaktiver Substanzen und Gemische in Oberflächenwässern als Beitrag zum Trinkwasserressourcenschutz – TP Monitoring-2 Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ Department Bioanalytische Ökotoxikologie

Dr. Eberhard Küster

Aufgrund der Corona Pandemie und der damit verbundenen Einschränkungen konnten die geplanten gemeinsamen Probenahmen von TP 5 und TP 6 nur zu einem geringen Teil durchgeführt werden.

2.4 Anknüpfung an den wissenschaftlichen und technischen Stand

2.4.1 Wirkungsbezogene Analytik mit Dünnschichtchromatographie

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) erlaubt es, Substanzen mit einem Fließmittel, das sich mit Hilfe der Kapillarkraft über die HPTLC-Platte bewegt, zu trennen. Bei der automatischen Mehrfachentwicklung wird die Platte in jedem Schritt bis auf die Höhe einer vorher definierten Laufstrecke des Fließmittels entwickelt. Nach Erreichen der Stufenhöhe wird das Fließmittel aus der Entwicklungskammer entfernt und die HPTLC-Platte unter Unterdruck getrocknet. Anschließend wird die Platte mit einer neuen Fließmittelzusammensetzung auf die nächsthöhere Stufe entwickelt. So ist eine Gradientenentwicklung, vergleichbar mit der HPLC, erreichbar. Dies ermöglicht die Trennung von Substanzen über ein weites Polaritätsspektrum. Zusätzlich führt eine AMD-Trennung zu einer Fokussierung der Banden und steigert damit die Trennleistung (Burger 1984). Da es sich bei der HPTLC/AMD um ein offenes Trennsystem handelt, lassen sich verschiedene Detektionsarten anwenden (Morlock 2010). Am häufigsten werden UV/VIS-aktive Substanzen durch das Messen der Remission über die Lauf-strecken der Proben mittels eines Mehrwellenlängenscans ortsabhängig erfasst.

Durch Besprühen der DC-Platten mit spezifischen Farbreagenzien ist es möglich, unterschiedliche funktionelle Gruppen in den aufgetrennten Banden (z.B. Aldehyd-, Keto-, Carboxylatoder Amingruppen) nachzuweisen. Durch elutionsbasierte Kopplung der HPTLC (Luftmann 2004) mit der LC-HRMS können diese Banden durch eine zweite Chromatographie (RP-Phase) weiter aufgetrennt und über die Massen- bzw. Fragmentionenspektren identifiziert werden. Diese Extraktion der DC-Bande kann vor und nach Derivatisierung durchgeführt werden und ermöglicht so, die gezielte Identifizierung der Moleküle mit relevanten funktionellen Gruppen.



Durch Kopplung der HPTLC mit einem Bioassay kann auf der HPTLC-Platte die Wirkung der getrennten Substanzen ermittelt werden (Wirkungsbezogene Analytik) (Weiss et al. 2017).

2.4.2 Non-Target-Screening

Seitdem die Flüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (LC-MS) in der Wasseranalytik regelmäßig eingesetzt wird, werden durch deren Nachweisempfindlichkeit immer neue organische Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt nachgewiesen. Die Entwicklungen bei den hochauflösenden Massenspektrometern (z.B. Time-of-Flight-Massenspektrometern, TOF), vor allem deren Empfindlichkeitssteigerung, eröffnen bei der Untersuchung von Wasserproben auf organische Spurenstoffe die Anwendung neuer, bisher nicht möglicher Strategien (Ibáñez et al. 2008; Bader et al. 2016, 2017).

Diese Analysensysteme liefern zu jedem Zeitpunkt des Chromatogramms das vollständige hochaufgelöste Massenspektrum sowie die Fragmentionenspektren und stellen somit für den Analytiker alle mit der angewandten Methode erzielbaren Informationen über die Wasserprobe zur Verfügung. Durch die verbesserte Empfindlichkeit der Analysensysteme ist es heute meist ohne Anreicherung möglich, organische Spurenstoffe im Konzentrationsbereich unterhalb von $0,1 \ \mu g/L$ zu bestimmen.

Die so erhaltenen teilweise großen Datenmengen erfordern neue strategische Herangehensweisen bezüglich ihrer Auswertung, so beispielsweise die Anwendung von multivariaten statistischen Methoden (Müller et al. 2011).

Aus der umfangreichen Informationsmenge, die der mehrdimensionale LC-HRMS-Datensatz beinhaltet, muss diejenige Information extrahiert werden, die für die Beantwortung der Fragestellung relevant ist. Dazu ist es notwendig, nicht nur eine Probe isoliert zu betrachten, sondern beispielsweise mehrere zeit- oder räumlich verknüpfte Proben miteinander zu vergleichen. Hierfür sind statistische Methoden der Chemometrie erforderlich, die erfolgreich in anderen Bereichen der Analytik eingesetzt werden. Der Analytiker benötigt Kenntnisse im Umgang (Anwendung, Aussage, Interpretation) mit diesen statistischen Methoden und der entsprechenden Software, die beispielsweise durch den Gerätehersteller bereitgestellt wird. Das Non-Target-Screening mittels LC-HRMS hat sich in der Forschungspraxis der Wasseranalytik inzwischen etabliert (Schymanski et al. 2015), wobei die Auswertung der Daten die größte Herausforderung darstellt.



2.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Bearbeitung des Teilprojekts der Landeswasserversorgung im Verbundforschungsvorhaben NeuroBox erfolgte in Zusammenarbeit mit 7 weiteren Institutionen. Da sich das TP 6 (UFZ Leipzig) mit der Identifizierung und toxikologischen Charakterisierung neuroaktiver Substanzen und Gemische in Oberflächenwässern als Beitrag zum Trinkwasserressourcen-schutz beschäftigt, erfolgte eine Zusammenarbeit hinsichtlich Probenahme. Geplante gemeinsame Probenahmen mussten bedingt durch die Hygienebedingungen infolge der Corona-Pandemie (die LW als Fernwasserversorger ist systemrelevant) abgesagt werden. Die anderen Teilprojekte wurden in den jeweiligen gemeinsamen Projektbesprechungen über den Fortschritt der Arbeiten in TP 5 informiert und dadurch ein Informationsaustausch sichergestellt.

3 Eingehende Darstellung der Forschungsergebnisse

3.1 Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen

3.1.1 Übersicht TP 5

Die zunehmende Anzahl organischer Spurenstoffe in den Rohwässern erfordert eine Anpassung der Strategie zur Überwachung von Trinkwasser. Zwar ist es beispielsweise mit der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HRMS) möglich, eine Vielzahl an Substanzen in den Wasserproben nachzuweisen, aber deren Identifizierung erfordert einen erheblichen Aufwand. Für eine vollständige toxikologische Bewertung einer Substanz ist wiederrum deren Identifizierung vorausgesetzt. Und selbst nach einer erfolgreichen Identifizierung einer im Wasser auftretenden Substanz kann eine schnelle Bewertung schwierig sein, da für viele Substanzen die notwenigen Daten nicht verfügbar sind.

Aus diesem Grund sollte in TP 5 die Wirkungsbezogene Analytik (WBA) mit dem Endpunkt der Acetylcholinesterase Hemmung als Monitoringwerkzeug zur Detektion von potentiell neurotoxischen Effekten in Roh- und Trinkwässern eingesetzt werden (Akkad 2010). Als Fraktionierungsme-thode wurde dafür die HPTLC verwendet. Ziel war es, die Methode zu optimieren und einen Ansatz zur Identifizierung von neurotoxischen Effekten zu entwickeln. In Abbildung 3-1 ist eine Übersicht der Arbeitsschritte dargestellt.





Abbildung 3-1: Übersicht der Arbeitsschritte

3.1.2 WBA mit HPTLC-Acetylcholinesterase (Grundlage der Methode)

Bei der Wirkungsbezogenen Analytik (WBA) handelt es sich um eine Kombination aus physikalisch-chemischer Analytik und Biotests. Dabei wird die Probe nach chromatographischer Trennung mit einem biologischen Testsystem kombiniert (Abbildung 3-2). Anhand der detektierten Wirkungen erfolgt anschließend eine Priorisierung, welche Substanzen bevorzugt identifiziert werden sollten (Brack 2003). Gleichzeitig kann die WBA als Monitoringsystem zur Detektion von biologischen Effekten herangezogen werden. Je nach Endpunkt werden beispielsweise hormonelle, gentoxische oder neurotoxische Effekte in Wasserproben nachgewiesen. Durch die Trennung ergibt sich ein Muster der Wirkung wodurch Veränderungen beispielsweise in der Rohwasserqualität frühzeitig erkannt werden.





Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC

Als ein besonders geeignetes Trennsystem für die WBA hat sich die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) erwiesen. Der Vorteil der HPTLC ist, dass nach der Trennung die Substanzen lösemittelfrei auf der HPTLC-Platte vorliegen. Dadurch haben die zur Trennung angewendeten Lösemittel keinen Einfluss auf den anschließenden Biotest. Als Biotest für neuroaktive Substanzen wird die Hemmung der Acetylcholinesterase verwendet (AChE-Hemmtest).

Das Enzym AChE kommt in vielen Organismen im vegetativen sowie dem zentralen Nervensystem und in neuromuskulären Synapsen vor (Mirjana et al. 2013). Dort hat es als Neurotransmitter die Aufgabe, Acetylcholin in Acetat bzw. Essigsäure und Cholin zu spalten und so eine Übererregung zu verhindern. Einige neurotoxisch wirkende Substanzen können eine Hemmung der AChE verursachen, beispielsweise Carbamate und Phosphorsäureester (z. B. Methiocarb und Dichlorvos). Dies führt dazu, dass das Acetylcholin nicht mehr gespalten wird. Es kommt zu einer dauerhaften Reizweiterleitung im synaptischen Spalt der Nervenzelle und damit zu Übererregung und Krämpfen. Abbildung 3-3 zeigt den aktiven Bereich der AChE mit dem mit angedockten Inhibitor m-(N,N,N-Trimethylammonium)trifluoracetophenon (TMTFA) an der Aminosäure S200. Markiert sind zudem die Aminosäuren D72 und W279 die den Zugang zum aktiven Zentrum darstellen. Den Mechanismus der Hydrolyse des Acetylcholins zeigt Abbildung 3-4 (Parveen et al. 2005)





Zur Detektion der Enzymhemmung wird als Substrat Indoxylacetat verwendet. Dieses wird von der AChE zu Indoxyl und Acetat umgesetzt. Indoxyl fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm blau. Sind in der Probe hemmende Substanzen vorhanden, erscheinen diese nach der Trennung als dunkle Bande vor einem blauen Hintergrund (Abbildung 3-5). Im Anhang 6.1 ist die Analysenvorschrift für die WBA mit HPTLC-AChE zusammengestellt.



Abbildung 3-5: Nachweis der Hemmung von AChE auf der HPTLC-Platte



Die unterschiedlich starke Wirkung der getrennten Fraktionen ergibt ein Wirkungsmuster für die Probe. Anhand der Veränderung des Wirkungsmusters während eines Prozesses (z. B. Abwasserbehandlung oder Trinkwasseraufbereitung) kann dieser ergänzend zu physikalisch-chemischen Analysendaten bewertet werden. Abbildung 3-6 zeigt das Beispiel einer Kläranlagenablaufprobe. Deutlich sind die dunklen Banden der aufgetrennten AChE Inhibitoren zu erkennen. Über das unterschiedliche Auftragevolumen der angereicherten Probe (Dosis) kann eine Dosis-Wirkungsbeziehung für einzelne Banden, ohne die Substanz zu kennen, abgeleitet werden. Ferner ist in Abbildung 3-6 im unteren Rf-Bereich eine Eigenfluoreszenz einiger Substanzen zu erkennen.



Abbildung 3-6: HPTLC-AChE Ergebnis eines Kläranlagenablaufs nach Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE) bei unterschiedlichen Auftragemengen

Ausgehend von einer im LW-Labor entwickelten Methode sollen im Rahmen des Projektes folgende methodischen Aspekte optimiert bzw. gelöst werden:

- Verbesserung der Trennleistung der HPTLC-Trennung
- Trennung polarer AChE-Inhibitoren
- Steigerung der Empfindlichkeit
- Metabolische Aktivierung von indirekt neurotoxisch wirkenden Substanzen

3.1.3 Verbesserung der Trennleistung (2-dimensionale Entwicklung)

Der größte Nachteil der (HP)TLC im Vergleich zur HPLC ist die geringere Anzahl theoretischer Böden. Daher befinden sich bei der Untersuchung von Umweltproben unter einer Hemmbande oftmals mehrere Substanzen, wodurch die Zuordnung der Wirkung zu einer Substanz



erheblich erschwert wird. Eine Verbesserung der Trennleistung der HPTLC konnte durch den Wechsel von einer isokratischen Trennung (Peakkapazität ca. 20) auf die automatisierte Gradiententrennung (Peakkapazität max. 40) erreicht werden. Eine weitere Verbesserung der Trennleistung der HPTLC ist durch die Optimierung der Trennbedingungen (Fließmittel, Trennschicht, Trennstrecke) je-doch nur sehr begrenzt möglich. Eine entscheidende Verbesserung der Trennleistung in der HPTLC kann jedoch mittels einer zweidimensionalen Entwicklung erzielt werden. Zu diesem Zweck wurde eine selektive 2-dimensionale HPTLC-Trennung entwickelt.

Bei der 2-dimensionalen HPTLC-Trennung wird nach Trennung in der ersten Dimension der Acetylcholinesterase-Hemmtest durchgeführt. Nur die hemmenden Banden werden von der HPTLC-Platte extrahiert, auf eine weitere Platte überführt und nochmals mit einem dem Rf-Wert angepassten Fließmittel aufgetrennt (Abbildung 3-7-A). Der Vorteil bei diesem Vorgehen ist, dass die nicht wirkenden Verbindungen vor der Trennung in der zweiten Dimension entfernt und nicht mehr beachtet werden müssen. Für eine optimale Trennung in der zweiten Dimension wird in Abhängigkeit von der Lage der Substanzen in der ersten Dimension eine spezifische Trennmethode angewendet. Damit ist es möglich, die ursprüngliche Peakkapazität nach der HPTLC/AMD-Trennung von 30 auf 204 zu erhöhen (Abbildung 3-7-B).



Abbildung 3-7: A) Prinzip des Ablaufs der selektiven 2D-Trennung und B) Bestimmung der Peakkapazität anhand eines Substanzgemisches (Stütz et al. 2017)





Abbildung 3-8: 2D HPTLC-AChE Hemmung einer dotierten Oberflächenwasserprobe (Stütz et al. 2017)

Abbildung 3-8 zeigt das Ergebnis einer dotierten Oberflächenwasserprobe. Deutlich ist die Auftrennung der Banden der ersten Dimension in der zweiten Dimension zu erkennen. Der Nachteil der wirkungsbasierten 2D-Trennung ist der erhebliche Aufwand allerdings nur für Proben die eine Wirkung in der ersten Dimension zeigen.

3.1.4 Trennung polarer Inhibitoren

Persistente, hochpolare und kleine Moleküle sind sehr mobil im Wasserkreislauf und geraten zunehmend in den Blickpunkt. Die Analytik dieser Stoffe gestaltet sich jedoch als besonders schwierig. Zu den hochpolaren Stoffen gehören Arzneimittel deren Wirkungsort die Acetylcholinesterase ist. Diese werden als Antidementivum zur Linderung der Alzheimer Erkrankung beispielsweise Galantamin, (log D -0,42) oder als Parasympathomimetikum (Ahmen die Wirkung des Parasympathikus nach) beispielsweise Neostigmin, (log D -2,28) eingesetzt. In Berlin wurden 2007 von den Antidementika Galantamin 419.400 Tagesdosen a 16 mg und von Donepezil 679.800 Tagesdosen a 7,5 mg verschrieben. Zu deren Vorkommen in der Umwelt ist derzeit wenig bekannt, was auf fehlende Routinemethoden zur Untersuchung von Wasserproben zurückzuführen ist. In Tabelle 3-1 sind die zugelassenen Arzneimittel mit Wirkung auf die AChE mit den Strukturformeln und dem logD-Wert zusammengestellt.



Substanz	Einsatz	Log D pH 7 (ChemAxxon)	Struktur
Donepezil	Antidementivum	2.66	
Rivastigmin	Antidementivum	0.61	$H_{3}C$ N H_{3}
Galantamin (Alkaloide aus Schneeglöckche nzwiebeln)	Antidementivum	-0.42	H ₃ C ⁻⁰ H ₃ C ⁻⁰ OH ₃
Distigmin	Parasympathomimetikum	-5.64	Hp P
Neostigmin	Parasympathomimetikum	-2.28	H ³ C-CH ³ CH ³ CH ³ CH ³ CH ³ CH ³ CH ³
Pyridostigmin	Parasympathomimetikum	-3.47	H ³ C H ³ CH ³
Edrophonium	Diagnostik von Muskelerkrankungen (Tensilon Test)	-1.28	HO H ₃ C I+ N CH ₃

Tabelle 3-1: Zugelassene Arzneimittel mit Wirkung auf die AChE

Für das im Projekt geplante Monitoringprogramm sollten diese Substanzen ebenfalls berücksichtigt werden. Aufgrund der Polarität dieser Verbindungen ist eine Trennung mit den herkömmlichen Fließmitteln auf der ebenfalls polaren stationären Phase der HPTLC-Platte nicht möglich. Ein Wechsel der stationären Phase würde den AChE-Hemmtest stören. Daher wurde eine neue HPTLC-Methode entwickelt, die durch Ausnutzung des Aussalzungseffekts, die starke Wechselwirkung der polaren Substanzen mit der polaren stationären Phase abschwächt. Dies ist in Abbildung 3-9 verdeutlicht. Die stationäre Phase (Kieselgel) bildet mit dem Wasseranteil des Fließmittels eine starre Wasserschicht aus der sich eine diffuse Wasserphase anschließt. Über die Salzkonzentration kann die Oberflächenladung der stationären Phase beeinflusst und damit das Gleichgewicht der Analyte zwischen den Phasen beeinflusst werden.





Abbildung 3-9 Darstellung des Prinzips der HILIC-Trennung (Alpert 2018)

Zur Optimierung der Methode wurden verschiedene Parameter wie die Salzauswahl und Konzentration variiert. Abbildung 3-10 zeigt den Einfluss von Salz und Konzentration auf den Rf-Wert für die Substanzen Donepezil, Neostigmin und Galantamin. NaCl und NaBr zeigten hier den größten Effekt wobei die Konzentration keinen eindeutigen Effekt auf den Rf-Wert hatte. Dagegen hatte die Konzentration einen Einfluss auf die Bandenverbreiterung. Abbildung 3-11 zeigt für die drei Substanzen die Bandenverbreiterung in Abhängigkeit der Salzkonzentration. Für die beiden Substanz Neostigmin und Galantamin mit einem negativen logD Wert ist dies besonders deutlich zu sehen.



Abbildung 3-10: Abhängigkeit des Rf-Wertes vom Salz und dessen Konzentration





Abbildung 3-11: Verbesserung der Bandenschärfe durch Erhöhung der Salzkonzentration

Für die gleichzeitige Trennung von polaren und eher unpolaren Substanzen wurde eine Methode mit 2 isokratischen Trennstufen entwickelt. In der ersten Stufe erfolgte die Trennung der polaren Substanzen mit Acetonitril/Wasser (50/50) und Zusatz von NaCl und in der zweiten Stufe die Trennung der unpolaren Substanzen mit Hexan/tert.-Butylmethylether/Methanol (18/80/2). Abbildung 3-12 zeigt das Ergebnis der gleichzeitigen Trennung von polaren und unpolaren Substanzen.





Abbildung 3-12: Gleichzeitige Trennung von polaren und unpolaren AChE-Inhibitoren mittels der HPTLC und anschließender Detektion der AChE-Hemmung.

In Abbildung 3-12 sind zusätzlich die Chlorid-Konzentrationen der Extrakte bei ausgewählten Rf-Werten mit angegeben. Bis zur Entwicklungshöhe der ersten Stufe liegt eine zunehmende Chlorid-Konzentration im Plattenextrakt vor. Durch die zweite Entwicklungsstufe wird im Wesentlichen kein Chlorid weiter transportiert. Die Validierungsergebnisse zeigen, dass die Trennung mit dieser Methode stabil ist.

3.1.5 Steigerung der Empfindlichkeit des Bioassays

Zur Optimierung der Empfindlichkeit des Acetylcholinesterase-Hemmtests wurden unterschiedliche Substrate auf der HPTLC-Platte verglichen. In der Tabelle 3-2 sind die in der Literatur beschriebenen Substrate für die AChE-Hemmung zusammengestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13 gegenübergestellt.



Substrat	Nachweis umgesetz- tes Substrat	Bemerkung bzw. λ_{ex} und λ_{em} beim fluoro-metrischen Nachweis	Literatur
Acetylthiocholiniodid Anfärben mit DTNB (Ellmann Reagenz)	Absorption (VIS)	Falsch-positive Ergebnisse $\lambda = 405 \text{ nm}$	(Ellman, et al. 1961) (Rhee, et al. 2003)
1-Naphthylacetat Anfärben mit Echtblausalz ("Fast blue b")	Absorption (VIS)	$\lambda = 533 \text{ nm}$	(C. Weins 2006)
Indoxylacetat	Absorption (VIS)/Fluoreszenz	$\lambda_{ex} = 366 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$ nicht wasserlöslich	(Mendoza, et al. 1968)
Resorufinacetat	Fluoreszenz	$\lambda_{ex} = 540 - 570 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$	(Guilbault 1965)
Acetylthiocholiniodid Weiterreaktion mit CPM Ma- leimide	Fluoreszenz	$\lambda_{ex} = 366 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$ nicht wasserlöslich	(Hadd et al. 1999; Hamada 2003)
7-Acetoxy-1-methyl-chinolini- umiodid (AMQI)	Fluoreszenz	Autohydrolyse $\lambda_{ex} = 403 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 502 \text{ nm}$	(Prince 1966)
2,6-Dichlorphenolindophenol- acetat	Absorption (VIS)	Licht- und Luftempfindlich (Beipackzettel Sigma Aldrich) $\lambda = 606 \text{ nm}$	(Pohanka 2013)

Tabelle 3-2: Zusammenstellung verschiedener Substrate für den Acetylcholinesterase-Hemmtest

Aufgrund der Ergebnisse ist ersichtlich, dass bei gleicher Auftragemenge lediglich bei Verwendung von Indoxylacetat ein Nachweis der Hemmung auf der Platte erfolgt.

Anhand der Fluoreszenzlöschung unterschiedlicher Auftragemengen kann für eine Bande die Wirkung (Hemmwert) des Inhibitors berechnet und eine Dosis Wirkungsbeziehung erstellt werden (Abbildung 3 14).





Abbildung 3-13: Zusammenstellung der Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Substrate. Konzentrationsreihe von Paraoxon-ethyl, Theobromin und Coffein (ohne chromatographische Trennung)



Abbildung 3-14: Dosis-Wirkungsbeziehung für Paraoxon-ethyl



3.1.6 Entwicklung eines Auswerteverfahrens für den Bioassay

Die Auswertung mehrerer Proben, beispielsweise mittels chemometrischer Methoden, erfordert eine hohe Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung und Detektion. Diese Reproduzierbarkeit erstreckt sich nicht nur auf eine Messserie, sondern beim Einsatz als Monitoring-Methode über einen größeren Zeitraum beispielsweise Monate oder Jahre. Betrachtet man die HPTLC-AChE Methode, so ergeben sich zwischen Dünnschichtplatten trotz gleicher Bedingungen Unterschiede in den Retentionsfaktoren (Rf-Werten). Dies wird in Abbildung 3-15 verdeutlicht.



Abbildung 3-15: Verdeutlichung der Schwankungen des Rf-Wertes zwischen und innerhalb der HPTLC-Platten

Es ist deutlich der Versatz zwischen den Chromatogrammen der beiden Platten zu erkennen. Aber auch innerhalb einer Platte treten Unterschiede im Rf-Wert auf (abhängig von der Lage der Trenn-Bahn (Track)). Zur Korrektur der inter- und intra-Rf-Wert-Schwankung war es erforderlich eine geeignete Korrekturmethode zu entwickeln.

Die hier entwickelte Rf-Wert Korrekturmethode basiert auf der Berechnung einer Verzerrungsfunktion. Gegebene Stützpunkte in Form von Marker-Signalen werden mithilfe einer Interpolationsfunktion miteinander verbunden. Bei dieser ermittelten Funktion handelt es sich um eine Polynomfunktion dritten Grades, die den kompletten Rf-Wert Bereich beschreibt. Die Berech-



nung der Differenz zwischen den ursprünglichen Rf-Werten und den Funktionswerten der Interpolationsfunktion an jedem Abtastpunkt, ergibt die korrigierten Rf-Werte. Bei dieser Art von Korrektur wird nur die 1. Dimension (1D) berücksichtigt. Werden für die Korrektur hingegen Interpolationsfunktionen an unterschiedlichen x-Positionen (Track) der HPTLC-Platte berechnet, erfolgt eine Rf-Wert Korrektur in zwei Dimensionen (2D). Die Korrektur der Bandenverschiebung erfolgt über Matlab mithilfe eines geeigneten Skriptes und wird sowohl unter der Betrachtung der 1D, wie auch der 2D durchgeführt (siehe Abbildung 3-16). Als Markersubstanzen wurden neun Substanzen, die über den kompletten Rf-Wert Bereich von 0 bis 1 verteilt sind verwendet (Chromatographie-Mix). Um die Korrektur innerhalb einer HPTLC-Platte durchzuführen, wird der Chromatographie-Mix mindestens zweimal, besser jedoch dreimal auf jede HPTLC-Platte aufgetragen. Der Erfolg der Korrektur ist in Abbildung 3-16 durch Angabe der Standardabweichung verdeutlicht. So reduziert sich beispielsweise die Standardabweichung des Rf-Wertes (Rf = 0,65) um den Faktor 5 (von 0,0065 auf 0,0013).



Abbildung 3-16: Anwendung des Korrekturalgorithmus und Verbesserung der Standardabweichungen

Im Unterschied zum Biolumineszenz-Auswertungsverfahren bei dem die Leuchtaktivität der Bakterien ermittelt wird, wird bei der Auswertung der AChE-Hemmung die Restaktivität des Enzyms ermittelt (Schulz et al. 2017). Damit ein (semi)quantitativer Vergleich der Stärke der Wirkung von Banden aus einer Probe bzw. zwischen Proben möglich ist, werden unterschiedliche Volumina der Probe aufgetragen. Anhand der unterschiedlichen Auftragevolumina und den dazugehörigen Restaktivtäten des Enzyms wird eine Dosis-Wirkungsbeziehung für jede Hemmbande über die Bildauswertung ermittelt (Abbildung 3-17 B). Aus dieser kann dann das Auftragevolumen ermittelt werden, welches notwendig ist, um eine Restaktivität von 50 % zu



erreichen. Der Kehrwert des berechneten Auftragevolumens für 50 %-Hemmung stellt das reziproke iso-Aktivitätsvolumen (RIAV) dar (Abbildung 3-17 C). Je größer das RIAV, desto stärker ist die Wirkung auf die AChE. Damit die Wirkungsmuster der verschiedenen Proben sich anhand der RIAV-Werte einfacher miteinander vergleichen lassen, werden diese Werte in einem Polardiagramm abgetragen (Abbildung 3-17 D). Zu beachten ist, dass die RIAV-Werte in einer logarithmischen Skalierung gezeigt werden.



Abbildung 3-17: Schematische Darstellung des Ablaufs der Auswertung des HPTLC-Acetylcholinesterase Hemmtests

In der Abbildung 3-18 ist am Beispiel der Behandlung des Ablaufs eines Nachklärbeckens einer Großkläranlage die Auswirkung der Pulveraktivkohlebehandlung auf die Hemmung der AChE dargestellt.





Abbildung 3-18: Auswertung des HPTLC-AChE Hemmtests über das reziproke iso-Aktivitätsvolumen von unbehandeltem und mit Aktivkohle behandeltem Nachklärbeckenablauf

Deutlich ist die Reduktion der Bandenanzahl durch die Aktivkohlebehandlung zu erkennen. Durch die Berechnung des reziproken iso-Aktivitätsvolumen ist zudem ein halbquantitativer Vergleich der Proben möglich. Beim Vergleich der beiden Bilder der AChE-Hemmung mit und ohne Pulveraktivkohle (PAK), würde die Schlussfolgerung nahelegen, dass die Bande bei Rf = 0,2 nach der PAK Behandlung intensiver geworden ist. Betrachtet man dagegen das reziproke iso-Aktivitätsvolumen so zeigt sich aber eine Reduktion der Hemmung.



3.1.7 Metabolische Aktivierung von indirekt neurotoxisch wirkenden Substanzen

Einige Substanzen wirken nicht direkt auf die Acetylcholinesterase, sondern erst nach metabolischer Aktivierung. Ein bekanntes Beispiel sind die oftmals als Insektizide eingesetzten Thiophosphorsäureester. Diese hemmen die Acetylcholinesterase nicht direkt, sondern erst das beim Metabolismus entstehende Oxon (Abbildung 3-19).



Abbildung 3-19: Metabolische Aktivierung von Thiophosphorsäureestern

In der Literatur ist ein Oxidationsverfahren mit Brom für die Umwandlung von Thiophosphorsäureester zu den entsprechenden Oxon-Verbindungen beschrieben. Neben dem Nachteil, des Umgangs mit dem Gefahrstoff Brom, können bei dieser Art der Oxidation, bromierte Nebenprodukte entstehen. Daher wird zur Nachstellung der metabolischen Aktivierung der aus Rattenleber gewonnene S9-Mix herangezogen. Die Aktivierung erfolgt separat vor der Auftragung auf die HPTLC-Platte. Hierzu werden zu 100 μ L Probe 20 μ L Phosphatpuffer (pH7), 15 μ L Kofaktorlösung und 4 μ L S9-Mix gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C wird die Probe auf die HPTLC-Platte aufgetragen. In Abbildung 3-20 ist das Ergebnis dargestellt.



Abbildung 3-20: HPTLC-AChE von dotierten Reinstwasserproben mit und ohne externe metabolische Aktivierung (Auftragemenge jeweils 270 µmol)



Die Proben sind jeweils ohne und mit S9-Aktivierung abwechselnd aufgetragen. Bei Parathionethyl und Parathion-methyl zeigt sich nach S9-Aktivierung eine Hemmbande beim Rf-Wert von Paroxon-ethyl bzw. Paraoxon-methyl. Dagegen erfolgte keine Umsetzung von Malthion zu Malaoxon. Allerdings zeigt sich bei der Umsetzung von Malaoxon mit S9, dass Maloxon vermutlich durch weitere Reaktionen umgesetzt wird und dadurch keine AChE-Hemmung auftritt.

Beim Vergleich der Hemmung der Acetylcholinesterase erreicht mit S9 aktiviertes Parathionethyl ca. 50 - 60 % der entsprechenden Hemmung von Paraoxon-ethyl. Dies kann durch mögliche weitere Reaktionen von Parathion-ethyl mit S9 beispielsweise zu p-Nitrophenol erklärt werden. Dies könnte auch für die die Substanzen Chlorpyrifos und Chlorpyrifos-methyl zutreffen.

Bei matrixbelasteten Oberflächenwässern, ist eine Aktivierung der Zielsubstanzen nach der Anreicherung mittels der Festphasenextraktion (SPE) nur bedingt möglich. Insbesondere Oberflächenwässer, die bei pH 2 über die SPE angereichert worden sind, ist eine externe S9-Aktivierung nur bedingt möglich. Abbildung 3-21 zeigt das Ergebnis für dotiertes Oberflächenwasser und einen Kläranlagenablauf. Die Aktivierung von Parathion-ethyl mit S9 erfolgt im Oberflächenwasser nur zu einem geringen Teil und im Kläranlagenablauf nicht.



Abbildung 3-21: Einfluss der Matrix bei der externen S9 Aktivierung



Zur genaueren Untersuchung dieses Effekts wurde eine künstliche Huminstoffprobe bei pH 2 und pH 7 mit der SPE angereichert. Es zeigte sich, dass die Huminstoffe bei pH 2 angereichert werden und die störenden Bestandteile sich aus dem Extrakt nicht durch einen Größenausschlussfilter (3 kDa) entfernen lassen. Vermutlich handelt es sich um Fulvosäuren die bei pH 2 aber nicht bei pH 7 angereichert werden. Abbildung 3-22 zeigt das Ergebnis des HPTLC-AChE-Hemmtests von dotierten pH 7 SPE-Extrakten eines Oberflächenwassers ohne und mit S9-Aktivierung. Auch hier konnte die Umsetzung von Parathion-ethyl zu Paraoxon-ethyl erfolgreich gezeigt werden, wohingegen die Umsetzung von Malathion-ethyl zu Malaoxon-ethyl nicht gelang.



Abbildung 3-22: HPTLC-AChE Trennung von dotiertem Oberflächenwasser ohne und mit S9-Aktivierung (für die Dotierung mit Malathion-ethyl und Malaoxon-ethyl wurde der S9-Mix 1:10 verdünnt)

Eine direkte Anwendung des S9-Mixes auf der HPTLC-Platte war bei verschiedenen Versuchsanordnungen erfolglos. Lediglich durch die Technik des Overspottings konnte eine Aktivierung mit S9 erreicht werden. Hierbei wird über die auf der HPTLC-Platte als Bande aufgetragene Probe der S9-Mix aufgetragen. Abbildung 3-23 zeigt das Ergebnis für einen Parathion-ethyl Standard mit eine Auftragemenge zwischen 0,2 ng und 20 ng. Bei der Verwendung von S9 aus der Rattenleber ist ein Blindwert dicht oberhalb der Bande von Paraoxon-ethyl zu erkennen. Deshalb liegt die Detektionsgrenze für Parathion-ethyl bei ca. 2 ng.



Zudem wurde der nicht tierische S9-Mix ewoS9R (RWTH Aachen University Institute for Environmental Research (Bio5) c/o EWOMIS) verwendet. Hierbei handelt es sich um nicht-tierisch gewonnene Phase I/II-Biotransformationsenzyme, die in der in vitro Metabolisierung verwendet werden. Diese sollen die aus der Rattenleber stammende S9-Fraktionen ersetzen. Aus Abbildung 3-23 ist zu erkennen, dass die metabolische Aktivierung mit dem ewo S9 nicht erfolgreich war. Die Ursachen konnten im Rahmen des Teilprojektes nicht gefunden werden.



Abbildung 3-23: S9 Aktivierung auf der HPTLC-Platte durch Overspotting, PTE: Parathionethyl

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass die S9-Aktivierung derzeit schwierig umzusetzen ist und nur für wenige Substanzen funktioniert, sodass dieser Ansatz in dem Projekt nicht weiterverfolgt wurde und zukünftige Arbeiten erfordert.



3.1.8 Non-Target-Analytik - WBA

Zur Identifizierung der Inhibitoren der AChE ist die Kopplung von WBA mit der HPLC-HRMS sinnvoll. Da sich auf der HPTLC-Platte nur wenige ng des Inhibitors befinden sind empfindliche spektrometrische Methoden erforderlich (Ouyang et al. 2016). Abbildung 3-24 zeigt schematisch die Verknüpfung von chemischer Substanzanalytik und biologischen Testverfahren.



Abbildung 3-24: Schematische Darstellung der kombinierten Anwendung von Non-Target-Analytik und Wirkungsbezogener Analytik

Die Grundlage des Verfahrens liegt in der Anwendung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HRMS). (J. Hollender et al. 2017) (Bader et al. 2016). Diese ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt des Chromatogramms die in der Ionenquelle gebildeten Ionen im gewählten Massenbereich zu detektieren und deren akkurate Masse zu bestimmen. Die Massendetektion kann mit einem Time of Flight Massenanalysator (TOF), einer Orbitrap oder einem anderen hochauflösenden Massenspektrometer (FT-ICR, Sector-MS) erfolgen. Als Mindestanforderung an hochauflösende Massenspektrometer ist ein Auflösungsvermögen von > 10.000 (Definition bei 10% iger Überlappung der zu trennenden Massepeaks) bzw. > 20.000 (Definition anhand der Halbwertsbreite des Massenpeaks) über den erfassten Massenbereich gefordert. Die Abweichung im MS-Spektrum zwischen gemessener (akkurater) und theoretischer (exakter) Massen sollte < 5 ppm bei m/z 200 betragen und durch regelmäßige Kalibration überprüft werden. Zur Identifizierung von Substanzen ist die Messung von MS²-Spektren mit akkurater Masse für einzeln ausgewählte (MS/MS bzw. ddMS2) oder wenn möglich gleichzeitig aller Precursorionen (MS/MSall bzw. AIF oder DIA) erforderlich. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt abhängig von der Fragestellung und wird in das Suspect-Target und Non-Target Screening gegliedert.



Beim Non-Target Screening werden LC-HRMS Chromatogramme mittels geeigneter Peakfinding-Software nach sog. Features durchsucht. Aufgrund von Isotopenpeaks sowie der Bildung unterschiedlicher Adduktionen eines Moleküls in der Ionenquelle und einer möglichen insource-Fragmentierung ist eine Komponentisierung erforderlich, d. h. eine Zusammenfassung aller Signale, welche ursprünglich von einer Komponente herrühren. Zur Entfernung von falsch positiven Features ist außerdem eine Blindwertkorrektur notwendig. Für den Vergleich unterschiedlicher Proben ist darüber hinaus ein Alignment sinnvoll. Anschließend erfolgt meist die Generierung von möglichen Summenformeln unter Verwendung der akkuraten Massen der Features und, wenn detektiert (Konzentration, Empfindlichkeit), der Isotopie (Bader et al. 2017; E. Schymanski et al. 2014). Die HPLC-HRMS Methode ist in 6.4 beschrieben.

3.1.9 Wirkungsbezogenes Monitoring potenziell neurotoxischer Effekte in Wasserproben

Mit der HPTLC-AChE Methode wurden unterschiedliche Oberflächengewässer und Kläranlagenabläufe untersucht. Die Anreicherung der Proben erfolgte mittels SPE um den Faktor 1000. In Abbildung 3-25 ist das Ergebnis einer Probenserie für die Donau (Rohwasser für die Trinkwassergewinnung in Langenau) dargestellt. Zu erkennen sind schwache Hemmungen der AChE im unteren Rf-Bereich. Das Muster der Hemmung ist in allen Proben ist nahezu gleich und variiert nur in der Intensität. Als Vergleich zeigt die erste Bahn den Blindwert der SPE Anreicherung. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse erfolgte die Untersuchung weiterer Oberflächengewässer. Abbildung 3-29 zeigt das Ergebnis. In einigen der Proben sind deutliche Hemmbanden zu erkennen. Besonders die Probe O4 zeigt im oberen Rf-Bereich mehrere Banden. Damit liefert die HPTLC-AChE Informationen über das Vorliegen von teils mehreren möglicherweise neurotoxischen Verbindungen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass in den Proben unterschiedliche Inhibitoren der AChE nachgewiesen wurden, eine Information die man ohne die Trennung nicht erhalten würde.





Abbildung 3-25: Detektion der AChE-Hemmung nach HPTLC-Trennung der mittels SPE anreicherten Trinkwasserproben aus der KW43 – 47 (2019)



Abbildung 3-26: Untersuchung von Zulauf- und Ablaufproben einer Kläranlage mittels HPTLC-AChE

Zur Demonstration der Anwendbarkeit des HPTLC-AChE-Hemmtests als Monitoring, erfolgte die Untersuchung des longitudinalen Profils eines Oberflächengewässers mit unterschiedlichen Zuflüssen und Einleitungen. Die Probenahme erfolgte mittels Large-Volume-SPE durch den



Projektpartner UFZ (TP 6). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-27 zusammengestellt. Zu erkennen ist eine Musteränderung entlang der Fließrichtung. Zudem tritt in einzelnen Proben eine intensive Hemmung bei einem Rf-Wert von 0,3 auf. Diese Band ist in Abbildung 3-27 bei Probe 14 rot markiert.



Abbildung 3-27: Zusammenstellung der HPTLC-AChE Ergebnisse der longitudinalen Beprobung eines Oberflächengewässers. Zusätzlich ist für die Proben 22, 23, 24 und 26 für den Rf-Bereich von 0,15 – 0,4 der Verlauf der Hemmung dargestellt. (Probenahme durch Large Volume SPE UFZ). Die rot markierte Bande (Probe 14) wurde mittels HPLC-HRMS untersucht.

Die Auswertung der Hemmung durch Summenbildung über die drei Rf-Bereiche:

- Rf = 0.061 0.374 (eher polare Komponenten)
- Rf = 0,375 0,687 (mittel polare Komponenten)
- Rf = 0,688 1 (eher unpolare Komponenten)

ist in Abbildung 3-28 dargestellt.





Abbildung 3-28: Darstellung der Summenwirkung aufgegliedert in Polaritätsbereiche eher polare (blau), mittel polare (rot) und eher unpolare (grün) Komponenten

Durch Extraktion der Bande und Untersuchung mittels HPLC-HRMS konnten als Ursache der AChE-Hemmung Tenside vom Typ Alkylbenzolsulfonat identifiziert werden.

Die Identifizierung von wirkenden Substanzen ist aufwändig. Am Beispiel der Hemmbande beim Rf-Wert 0,86 der Probe O5 (Abbildung 3-29) soll die Strategie der Identifizierung gezeigt werden. In Abbildung 3-30 ist die Vorgehensweise zusammengefasst.



Abbildung 3-29: Untersuchung unterschiedlicher Oberflächengewässer (DW Donauwasser, RW Reinwasser, KBW Kartuschen-Blindwert)



Die Analyse der SPE angereicherten Wasserprobe mittels Flüssigkeitschromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie (HPLC-HRMS) liefert einen Masse-Retentionszeit Scatterplot aller detektierbaren Signale in der Probe. Mit Hilfe des TLC-MS Interface wird die Bande (2. Trennung, vor der Detektion mit AChE) extrahiert und unter gleichen Bedingungen wie der original Probenextrakt mittels HPLC-HRMS analysiert.



Abbildung 3-30: Strategie zur Identifizierung der Wirksubstanz

Von den beiden Masse-Retentionszeit Scatterplots wird entsprechend der Mengenlehre die Schnittmenge gebildet. In dieser Schnittmenge befinden sich die Signale der Substanzen die in der Wasserprobe und in der Hemmbande vorliegen. Deutlich ist die Reduzierung der Anzahl an möglichen Signalen zu erkennen (Abbildung 3-30, C). Der nächste Schritt besteht in der Identifizierung der Substanz(en) über das MS/MS Spektrum und entsprechender Datenbanken. In diesem Beispiel konnte die Substanz als Diazinon identifiziert werden. Zur Verifizierung des Ergebnisses erfolgte die Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Diazinon (Abbildung 3-31). Über die Hemmung wurde eine Konzentration an Diazinon von 1,8 µg/L abgeschätzt.




Abbildung 3-31: Dosis-Wirkungsbeziehung für Diazinon und Konzentrationsabschätzung

Als weiteres Beispiel für die Anwendung des HPTLC-AChE-Hemmtests als Monitoring-Tool wurde die Kläranlage Steinhäule bei Ulm ausgewählt (Abbildung 3-32). Hierbei sollten die einzelnen Stufen der Abwasserreinigung auf ihre Effektivität zur Entfernung von neurotoxischen Wirkungen untersucht werden. Die Probenahmestellen sind in Abbildung 3-32 dargestellt. Beprobt wurden Zulauf (nach Sandfang), Ablauf Nachklärbecken und Ablauf Sandfilter nach Aktivkohle (4. Reinigungsstufe) an 4 aufeinanderfolgenden Tagen als 24 h Mischprobe. Die Proben wurden mittels SPE um den Faktor 1000 (ausgenommen Zulauf Faktor 100) angereichert.





Abbildung 3-32: Untersuchung der Effektivität einer Kläranlage mittels HPTLC-AChE-Hemmtest.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein SPE-Blindwert mit analysiert. Es erfolgte eine 2D Korrektur der Rf-Werte auf der Basis von 4 Tracks des Chromatographie-Mixes über die Platte verteilt (siehe 3.1.6).

Die Ergebnisse der einzelnen Tage sind in der Abbildung 3-32 als Bild der Trennung und überlagertes Hemmwert-Chromatogramm mit dargestellt. Deutlich ist eine intensive Bande und mehrere Banden geringer Intensität im Zulauf zu erkennen. Zwischen den Tagen treten nur geringe Unterschiede auf. Erst durch das Hemmwert-Chromatogramm wird deutlich, dass die intensive Bande (Rf-Wert = 0,30) möglicherweise ein Doppelpeak ist. Die intensive Bande wird durch die Abwasserreinigung bereits in der biologischen Stufe nahezu vollständig entfernt. Zudem zeigt die Probe eine zusätzliche Bande bei einem Rf-Wert von 0,70 (zu beachten ist der



höhere Anreicherungsfaktor von 1000 gegenüber 100 der Zulaufprobe). Diese Wirkung wird in der 4. Reinigungsstufe entfernt. Außer einer diffusen Reduktion der Wirkung (geringerer Untergrund) ist ein zusätzlicher Effekt durch die Aktivkohle und nachgeschaltetem Sandfilter bei der AChE nicht zu erkennen.

Unterschiede des Wirkmusters können durch optischen Vergleich der Hemmwert-Chromatogramme ermittelt werden. Derartige "optische Vergleiche" unterliegen subjektiven Einschätzungen von Unterschieden der Wirkung und sind deshalb nur für "deutliche" Unterschiede anwendbar. Wenn aber geringe signifikante Musterveränderungen in einem Datensatz ermittelt werden sollen sind chemometrische bzw. multivariate Methoden erforderlich. Zwei wichtige multivariate Methoden zur Datenauswertung sind die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die Clusteranalyse. Der Datensatz besteht aus den Hemmwerten beispielsweise der 4 Proben und 1000 Variablen (Rf-Wert von 0 - 1 unterteilt in 0,001 Schritte) entsprechend einer 4 x 1000 Matrix. Die PCA reduziert die Dimensionalität des Datensatzes durch Linearkombination der Variablen auf wenige Variablen genannt Hauptkomponenten (PC) unter Beibehaltung der Varianz des Ausgangsdatensatzes. Die Darstellung des Ergebnisses erfolgt in einem Score-Plot für die Proben und dem Loading-Plot für die Variablen. Je stärker eine Variable auf eine Hauptkomponente lädt, desto größer ist der Faktor dieser Variablen bei der Linearkombination der Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente.

Die ersten beiden PCs beschreiben 86 % (PC1 63,5 % + PC2 22 % = 85,5 %) der Varianz des Ausgangsdatensatzes. Die drei Probenahmestellen können mit der PCA deutlich unterschieden werden (Abbildung 3-33).

Die Lage des Zulaufs wird im Wesentlichen durch die Variable Rf = 0,30 bestimmt, diese lädt stark auf PC1 (Abbildung 3-33). Die Lage der Proben Nachklärbecken wird dagegen im Wesentlichen durch die Variable mit Rf = 0,70 bestimmt die stark auf PC2 lädt (Abbildung 3-33). Die Proben vom Ablauf der 4. Reinigungsstufe unterscheiden sich im Score-Plot deutlich von denen des Nachklärbeckens (Abbildung 3-33). Diesen deutlichen Unterschied hätte man aus der Betrachtung allein der Hemmwert-Chromatogramme nicht geschlossen. Diese Auswertung verdeutlicht zudem, wie wichtig eine Rf-Korrektur der Daten ist, da sonst Artefakte zu falschen Interpretationen führen können.

Neuro 🍟 BoX



Abbildung 3-33: Auswertung der Hemmwert-Chromatogramme mittels Hauptkomponentenanalyse

3.1.10 Anwendung der Large Volume Anreicherung (TP 6)

Mit der Large Volume Solid Phase Extraktionsapparatur des Umweltforschungszentrums (UFZ) wurden jeweils 100 L Probe angereichert. Das große Probevolumen ist notwendig, um ein ausreichendes Extraktvolumen für den Fischembryonentest (UFZ) zu erhalten. Es wurden drei Oberflächenwässer aus Deutschland untersucht. An jedem Probenahmeort wurde zusätzlich zur Probe eine Feldblindprobe mit Reinstwasser erzeugt. Das Ergebnis des HPTLC-AChE-Hemmtests ist in Abbildung 3-34 dargestellt. Bei den Blindwerten und den Proben tritt eine starke Hemmung an der Auftragezone auf. Diese wird wahrscheinlich durch das verwendete SPE-Material verursacht. Im Bereich der Trennung sind keine weiteren durch den Blindwert versachte Hemmungen erkennbar. Auffällig starke Hemmungen über nahezu den gesamten Chromatographiebereich wurden für die Probe "Spittelwasser" (Abbildung 3-34, Bahn 1 und 2) detektiert. Ebenfalls viele Hemmbanden wurden für ein Oberflächenwasser, in dessen Einzugsgebiet viel Gemüse in Gewächshäusern angebaut wird, erfasst (Abbildung 3-34, Bahn 4).



Wenig auffällig ist dagegen die Probe von der Donau oberhalb der Kläranlage Steinhäule (Abbildung 3-34, Bahn 6). Für die Probe vom Zulauf der Kläranlage Steinhäule werden erwartungsgemäß viele deutliche Hemmbanden detektiert (Abbildung 3-34, Bahn 10), die nach dem Aufreinigungsprozess (Kläranlagen Ablauf, Abbildung 3-34, Bahn 7) deutlich reduziert werden. Die verbleibenden AChE-Hemmbanden befinden sich im Bereich von polaren Verbindungen (Rf = 0 - 0,2). In der Donau nach der Einleitung des geklärten Abwassers sind nur schwache AChE-Hemmungen zu erkennen (Abbildung 3-34, Bahn 8). Am deutlichsten ist noch die Hemmung für die Bande mit Rf = 0,1 zu sehen. Im Trinkwasser (Abbildung 3-34, Bahn 9) wurde eine auffällige Hemmbande detektiert, deren Ursache nicht geklärt werden konnte.





Abbildung 3-34: Detektion der AChE-Hemmung nach HPTLC-Trennung der Probenextrakte von der Large Volume Solid Phase Extraktionsapparatur des Umweltforschungszentrums.



3.1.11 Referenzsubstanzen

In Tabelle 3-3 sind die Referenzsubstanzen mit den Rf-Werten für unterschiedliche Trennmethoden zusammengestellt. Außerdem ist eine qualitative Bewertung der AChE-Hemmung mit angegeben.

Tabelle 3-3: Zusammenstellung	ler Rf-Werte und AChE-Hemmung	der Referenzsubstanzen

Substanz	Summenformel	Rf-Wert	Methode	Wirkung AChE
Paraoxon-ethyl	C10H14NO6P	0.78 / 0.32 / 0.79	1/2/3	+++
Donepezil	C24H29NO3	0.71/0.35	1/3	++
Neostigmin	C12H19N2O2	0,49	1	++
Galantamin	C17H21NO3	0.54 / 0.28	1/3	++
Pyridostigmin	C9H13N2O2	0,44	1	++
Edrophonium	C10H16NO+	0,57	1	+++
Rivastigmin	C14H22N2O2	0.63	1	+
BAAD (1,5-Bis(4-allyldimethylammoniumphenylpentan-3-one)	C27H38N2O	0,42	1	++
Distigmin	C22H32Br2N4O4	0,32	1	++
Omethoat	C5H12NO4PS	0.66	1	++
Fenthion-oxon-sulfoxid	C10H15O5PS	0.64	1	+
Methiocarb-sulfoxid	C11H15NO3S	0.65	1	+++
Aldicarbsulfon	C7H14N2O4S	0.71	- 1	++
Oxamvl	C7H13N3O3S	0.67	1	+++
Parathion-ethyl	C10H14NO5PS	0.61	2	+
Diazinon-oxon	C12H21N2O4P	0.22	2	++
Carbaryl	C12H11NO2	0.5	2	+++
Aldicarb	C7H14N2O2S	0.33	2	+++
Malaoyon	C10H19O7PS	0,33	2	
Dichlonos	CAH7CI2OAR	0,32	2	
Diction vos	C11H18N4O2	0,32	2	
Disting	C12H21N2O2DS	0,51	2	
Malathian	C12H2IN2OSF3	0,87	2	
Chlorowifes	C10H1900P32	0,7	2	
Chloropyrilos	C9H11CI3NO3P3	0,74	2	+
Chloropyritos-oxon	C9H11CI3NO4P	0,6	2	+++
Chloropyrilos-methyl even	C/H/CI3NO3PS	0,72	2	+
Chiorpyrilos-methyl-oxon	C/H/CI3NO4P	0,53	2	++
Paratnion-methyl	C8H10NOSPS	0,68	2	+
Paraoxon-metnyi	C8HIUNU6P	0,27	2	+++
Phosmet	CIIHI2N04PS2	0,6	2	+
Phosmet-oxon	C11H12N05PS	0,22	2	+++
Pirimiphos-ethyl	C13H24N3O3PS	0,72	2	+
Pirimiphos-ethyl-oxon	C13H24N3O4P	0,44	2	+++
Fenthion	C10H1503PS2	0,69	2	+
Fenithrothion	C9H12NO5PS	0,67	2	+
Fenithrothion-oxon	C9H12NO6P	0,24	2	+++
Methiocarb	C11H15NO2S	0,62	2	+++
Methiocarb-sulfon	C11H15NO4S	0,36	2	++
Fenoxycarb	C17H19NO4	0,63	2	+
Indoxacarb	C22H17CIF3N3O7	0,68	2	+
Celecoxib	C17H14F3N3O2S	0,71	3	+
Celecoxib-carboxylic acid	C17H12F3N3O4S	0,18	3	+
Imidacloprid	C9H10CIN5O2	0,62	3	+
Thiamethoxam	C8H10CIN5O3S	0,53	3	0
Clothianidin	C6N5H8SO2CI	0,46	3	0
Acetamiprid	C10H11CIN4	0,59	3	+
Thiacloprid	C10H9CIN4S	0,65	3	+
Carbamazepin	C15H12N2O	0,58	3	+
Diazepam	C16H13CIN2O	0,68	3	+
Nonylphenol	C15H24O	0,82	3	+
Coffein	C8H10N4O2	0,52	3	(+)
Methode 1: Isokratische Trennung für polare AChE-Inhibitoren, H ₂ O	ACN 50:50 mit 250 mM NaCl			
Methode 2: Isokratische Trennung mit 100 % TBME				
Methode 3: Trennung an der AMD mit "Fingerprint"-Gradient				

Die Untersuchung von Referenzsubstanzen mit dem HPTLC-AChE-Hemmtest zeigte, dass einige dieser Materialien zwar nach physikalischer Detektion als sehr rein eingestuft werden, doch einige der verbleibenden Verunreinigungen weisen eine starke Wirkung auf die Acetyl-



cholinesterase auf (Abbildung 3-35). Hierbei ist zu beachten, dass unter Umständen die Verunreinigungen durch Oxidationsprozesse bei der Auftragung größerer Mengen auf die HPTLC-Platte entstehen könnten.



Abbildung 3-35: Untersuchung der Reinheit von Referenzmaterial mit dem Acetylcholinesterase-Hemmtest nach HPTLC-Trennung.

3.1.12 Zusammenfassung Ergebnisse

Die Wirkungsbezogenen Analytik mit HPTLC-AChE ist eine Methode die es ermöglicht in einer Wasserprobe nach Anreicherung Inhibitoren der AChE zu detektieren. Die begrenzte Trennleistung bzw. Peakkapazität der HPTLC erschwert die Identifizierung der aktiven Substanzen. Durch Entwicklung einer zwei dimensionalen wirkungsbasierten Dünnschichtchromatographie konnte die Peakkapazität um den Faktor 6 erhöht werden. Allerdings ist aufgrund des damit verbundenen Aufwands dies nur für entsprechend belastete relevante Proben sinnvoll.

Die große Polaritätsspanne relevanter AChE-Inhibitoren erforderte die Entwicklung einer Trennmethode die sowohl relativ unpolare als auch polare Verbindungen gleichzeitig trennt. Hier wurde die HILIC-Trennung der HPLC auf die HPTLC übertragen. Dies ermöglicht die Detektion u.a. von Antidementiva in Wasserproben deren Verordnungsmenge in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat.



Zur Detektion indirekt wirkender Inhibitoren wurde die S9-Aktivierung versucht auf die HPTLC-Platte zu übertragen. Eine Aktivierung nach der Trennung war nicht erfolgreich. Eine Aktivierung der Probe vor der Auftragung auf die HPTLC-Platte und anschließender Trennung war nicht für alle Substanzen erfolgreich. Es zeigte sich bei dieser externen S9-Aktivierung, dass Matrixbestandteile insbesondere Huminstoffe die Aktivierung stören. Diese Störung kann durch SPE-Anreicherung der Probe bei pH 7 anstatt bei pH 2 vermieden werden. Dies ist allerdings mit dem Verlust von sauren Verbindungen bei der Anreicherung verbunden. Es konnte im Ansatz gezeigt werden, dass eine Aktivierung nach dem Auftragen der Probe auf die HPTLC-Platte durch Overspotting prinzipiell funktioniert auch bei pH 2 angereicherten Proben.

Anhand eines umfangreichen Untersuchungsprogramms von Kläranlagenablauf, Oberflächenwasser, Rohwassers und Trinkwasser und konnte gezeigt werden, dass die HPTLC-AChE-Hemmung einen Informationsgewinn darstellt. Hierbei besteht die entscheidende Information in der Detektion von Wirkung und der Veränderung der Wirkung durch den Prozess beispielsweise auf der Kläranlage oder der Trinkwassergewinnung.

Durch Kombination mit der HPLC-HRMS konnten einige für die Wirkung verantwortliche Substanzen identifiziert werden. Hierzu gehören die Alkybenzolsulfonate (z. B. Dodecylbenzolsulfonat). Die Hemmung der AChE durch diese Substanzen liegt vermutlich in der Blockierung des Zugangs zum Rezeptor aufgrund der Molekülgröße.

3.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

3.2.1 Personal

Die entstandenen Ausgaben zum Projektende für die Beschäftigten (0812) belaufen sich auf 28.930,28 € (34.230 € im Gesamtfinanzierungsplan). Finanziert wurden davon die Projektleitung mit den jeweils in den Kostenkalkulationen 2018, 2019 und 2020 genannten Beschäftigungsdauern.

Weiterhin belaufen sich die entstandenen Ausgaben zum Projektende für die Beschäftigten (0817) auf 164.734,46 € (153.155 € im Gesamtfinanzierungsplan). Finanziert wurden davon ein wissenschaftlicher Mitarbeiter und eine Laborfachkraft mit den jeweils in den Kosten-kal-kulationen 2018, 2019 und 2020 genannten Beschäftigungsdauern.



3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Unter der Position 0843 für Verbrauchsmaterialien sind bis zum Projektende Ausgaben in Höhe von 53.555,76 € (45.000 € im Gesamtfinanzierungsplan) angefallen. Diese Mittel wurden benötigt für Betriebsmittel HPTLC, HPTLC-Platten, SPE-Kartuschen, andere Lösungsmittel, Filter und Fritten, Referenzmaterialien und Referenzlösungen etc.

3.2.3 Dienstreisen

Die entstandenen Ausgaben zum Projektende für Dienstreisen (0846) belaufen sich auf 3.304,08 € (6.000 € im Gesamtfinanzierungsplan). Es sind für folgende Veranstaltungen Reisekosten entstanden: Projekttreffen des NeuroBox-Konsortiums.

3.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die vorliegenden Ergebnisse des Teilprojekts der Landeswasserversorgung zeigten am Beispiel der WBA mit HPTLC-AChE-Hemmung, dass diese Methode geeignet ist AChE Inhibitoren in Wasserproben zu detektieren. Damit steht beispielsweise der Rohwasserüberwachung eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt Substanzen in einer Wasserprobe nachzuweisen allein über deren Wirkung ohne Kenntnis der chemischen Struktur.

Die Bearbeitung des Forschungsvorhabens erfolgte unter Einhaltung des Finanzierungsplanes, wobei der größte Anteil der Ausgaben für Personalmittel anfiel. Die wissenschaftlichen Untersuchungen wurden vom Projektingenieur und den Chemielaboranten sowie den studentischen Mitarbeitern durchgeführt. Die Leitung, die Koordination und die Vorstellung der Projektergebnisse wurden von den beteiligten Wissenschaftlern übernommen. Die Ausgaben für die Verbrauchsmaterialien im Labor und die erfolgten Dienstreisen im Projektzeitraum blieben ebenfalls im beantragten Rahmen.

Die Ergebnisse wurden in Publikationen, Postern und Vorträgen dem Fachpublikum vorgestellt (siehe 3.6).



3.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Teilprojekt der Landeswasserversorgung in NeuroBox wurde eine Methode zum Nachweis von AChE-Inhibitoren in Wasserproben weiterentwickelt und in der Anwendung erprobt. Die Methode wird bei der Landeswasserversorgung zur Überwachung der unterschiedlichen Rohwasserressourcen und des Trinkwassers routinemäßig eingesetzt. Die HPTLC-AChE-Hemmung stellt ein komplementäres Monitoring zur Target- und Non-Target-Analytik dar und liefert somit einen Beitrag zur Sicherstellung der Trinkwasserqualität.

3.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte

Während der Projektlaufzeit sind dem Zuwendungsempfänger keine Arbeiten über weitere Fortschritte in der Anwendung der HPTLC-AChE-Hemmung zur Untersuchung von Wasserproben bekannt geworden.

3.6 Erfolgte Veröffentlichungen

Stütz, L., Weiss, S.C., Schulz, W., Schwack, W., Winzenbacher, R. (2017): Selective two-dimensional effect-directed analysis with thin-layer chromatography, Journal of Chromatography A, 1524, 273-282.

D. Oberleitner, L. Stütz, W. Schulz, A. Bergmann, C. Achten (2020) Seasonal performance assessment of four riverbank filtration sites by combined non-target and effect-directed analysis, Chemosphere 261 (2020) 127706 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127706

Posterbeiträge auf Konferenzen

Stütz, L., Weiss, S.C., Schulz, W., Schwack, W., Winzenbacher, R. (2017) Selective two-dimensional effect-directed analysis with TLC, Poster und Tagungsbandbeitrag, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Berlin, 4. – 8. Juli 2017.

Weiss, S.C., Stütz, L., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2017) Semi-quantitative comparison of acetylcholinesterase inhibition in effect-directed analysis with HPTLC, Poster und Tagungsbandbeitrag, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Berlin, 4. – 8. Juli 2017.



Vorträge

Weiß, S.C., Stütz, L., Schulz, W., Seitz, W., Winzenbacher, R. (2018): Einsatz der Wirkungsbezogenen Analytik zur Untersuchung der Abwasserbehandlung mit Aktivkohle, Vortrag und Tagungsbandbeitrag, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Papenburg, 07. - 09. Mai, ISBN 978-3-947197-05-7

Weiß, S.C., Stütz, L., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2018): The capabilities of effect-directed analysis with HPTLC in environmental analysis, Vortrag, Forum Labo Lyon – Club de CCM, Lyon, 28. März

Stütz, L., Schulz, W., Winzenbacher, R., Happel O., Schmutz, B., Scheurer, M. (2020) Wirkungsbezogene Analytik in der Trinkwasseraufbereitung, Tagungsbandbeitrag, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft

Schulz, W. (2019): Non-Target Screening und Wirkungsbezogene Analytik - eine Kombination der Zukunft, Vortrag, Fortbildungsverbund Boden und Altlasten Baden-Württemberg, Stuttgart, 01. Oktober

Stütz, L. (2019): Wirkungsbezogene Analytik zur Priorisierung und Erstbewertung organischer Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt, Vortrag, Fachkolloquium Trinkwasser WWU, Gelsenkirchen, 02. September

4 Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Förderung des Teilprojekts der Landeswasserversorgung im Rahmen des Verbundvorhabens "Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf (NeuroBox)".

Für die gute, kollegiale und konstruktive Zusammenarbeit wird allen Projektpartner aus dem NeuroBox-Konsortium gedankt.

Weiterhin bedanken wir uns bei Dr. Daniel Jost und Ellen Ernst (Projektträger Karlsruhe Wassertechnologie) für die freundliche und kompetente Betreuung während der Durchführung des Forschungsvorhabens.



5 Literaturverzeichnis

Akkad, R.; Schwack, W. (2010): Multi-enzyme inhibition assay for the detection of insecticidal organophosphates and carbamates by high-performance thin-layer chromatography applied to determine enzyme inhibition factors and residues in juice and water samples. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 878 (17-18), S. 1337–1345. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.021.

Alpert, Andrew J. (2018): Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography. In: *Journal of chromatography. A* 1538, S. 45–53. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.01.038.

Bader, Tobias; Schulz, Wolfgang; Kümmerer, Klaus; Winzenbacher, Rudi (2016): General strategies to increase the repeatability in non-target screening by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. In: *Analytica chimica acta* 935, S. 173–186. DOI: 10.1016/j.aca.2016.06.030.

Bader, Tobias; Schulz, Wolfgang; Kümmerer, Klaus; Winzenbacher, Rudi (2017): LC-HRMS Data Processing Strategy for Reliable Sample Comparison Exemplified by the Assessment of Water Treatment Processes. In: *Analytical chemistry* 89 (24), S. 13219–13226. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03037.

Brack, Werner (2003): Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 377 (3), S. 397–407. DOI: 10.1007/s00216-003-2139-z.

Brufani, M. (Hg.) (2000): Rational design of cholinesterase inhibitors, in Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. Unter Mitarbeit von E. Giacobini: Martin Dunitz Ltd. London.

Burger, K. (1984): DC-PMD, Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie. In: *Z. Anal. Chem.* 318 (3-4), S. 228–233. DOI: 10.1007/BF00528586.

C. Weins (2006): Möglichkeiten und Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik mit der HochleistungsDünnschichtchromatographie.

E. Schymanski; J. Jeon, R. Gulde; K. Fenner; M. Ruff; H. Singer und J. Hollender (2014): Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating confidence. In: *Environmental science & technology* 48, S. 2097–2098.

Ellman, G. L., et al. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. In: *Biochemical Pharmacology* (7(2)), S. 88–95.

Hadd, A. G.; et al. (1999): Microfluidic Assays of Acetylcholinesterase Inhibitors. In: *Analytical chemistry* 71 (22), S. 5206–5212.



Hamada, M.; R. Wintersteiger (2003): Fluorescence screening of organophosphorus pesticides in water by an enzyme inhibition procedure on TLC plates. In: *Journal of Planar Chromatography* 16 (1), S. 4–10.

Ibáñez, María; Sancho, Juan V.; Hernández, Félix; McMillan, Daniel; Rao, Ramesh (2008): Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-light mass spectrometry. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (5), S. 481–489.

J. Hollender; E. Schymanski; H. Singer und P. Ferguson (2017): Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go? In: *Environmental science & technology* 51, S. 11505–11512.

Luftmann, Heinrich (2004): A simple device for the extraction of TLC spots. direct coupling with an electrospray mass spectrometer. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 378 (4), S. 964–968.

Mirjana, B.; Dolovic, Danijela Z. Krstic; Tamara D. Lazarevic-Pasti; Aleksandra M. Bondzic (2013): Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. In: *Current Neuropharmacology* 11, S. 315–335.

Morlock, Gertrud; Schwack, Wolfgang (2010): Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (10), S. 1157–1171. DOI: 10.1016/j.trac.2010.07.010.

Müller, Alexander; Schulz, Wolfgang; Ruck, Wolfgang K. L.; Weber, Walter H. (2011): A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. In: *Chemosphere* 85 (8), S. 1211–1219. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.009.

Ouyang, X.; Leonards, P. E. G.; Tousova, Z.; Slobodnik, J.; Boer, J. de; Lamoree, M. H. (2016): Rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by Effect-Directed Analysis using LC×LC fractionation, a high throughput in vitro assay and parallel identification by Time of Flight mass spectrometry. In: *Analytical chemistry* 88 (4), S. 2353–2360.

Parveen, M.; S. Kumar; Ed. (2005): Recent Trends in the Acetylcholinesterase System. Amsterdam u.a.: IOS Press.

Pohanka, M.; P. Dobes (2013): Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, But Not Butyrylcholinesterase. In: *International Journal of Molecular Sciences* 14 (5), S. 9873–9882.

Prince, A. K. (1966): Spectrophotometric study of the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of 1methyl-acetoxyquinolinium iodides. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 113 (1), S. 195–204.

Rhee, I. K., et al. (2003): Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. In: *Phytochemical Analysis* 14 (3), S. 127–131.



Schulz, W.; Seitz, W.; Weiss, S. C.; Weber, W. H.; Böhm, M.; Flottmann, D. (2008): Use of Vibrio fischeri for screening for bioactivity in water analysis. In: *Journal of Planar Chromatography* 21 (6), S. 427–430.

Schulz, Wolfgang; Weiss, Stefan C.; Weber, Walter H.; Winzenbacher, Rudi (2017): The reciprocal iso-inhibition volume concept: A procedure for the evaluation in effect-directed analysis with thinlayer chromatography - using the thin-layer chromatography-luminescent bacteria assay as an example. In: *Journal of chromatography*. *A* 1519, S. 121–130. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.076.

Schymanski, Emma L.; Singer, Heinz P.; Slobodnik, Jaroslav; Ipolyi, Ildiko M.; Oswald, Peter; Krauss, Martin et al. (2015): Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (21), S. 6237–6255. DOI: 10.1007/s00216-015-8681-7.

Stütz, Lena; Weiss, Stefan C.; Schulz, Wolfgang; Schwack, Wolfgang; Winzenbacher, Rudi (2017): Selective two-dimensional effect-directed analysis with thin-layer chromatography. In: *Journal of chromatography*. A 1524, S. 273–282. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.009.

Weiss, Stefan C.; Egetenmeyer, Nicole; Schulz, Wolfgang (2017): Coupling of In Vitro Bioassays with Planar Chromatography in Effect-Directed Analysis. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 157, S. 187–224. DOI: 10.1007/10_2016_16.



6 Anhang

Abkürzungen:

HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
AMD	Automatisierte Mehrfachentwicklung
AChE	Acetylcholinesterase
РАК	Pulveraktivkohle
NTS	Non-Target-Screening
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie

6.1 Methodenbeschreibung Wirkungsbezogene Detektion mit AChE



Abbildung 6-1: Ablauf der HPTLC-AChE-Analyse



Herstellung der Lösungen

- Puffer-Lösung (0,5 M TRIS/HCl-Puffer-Lösung, pH 7,8)

12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) werden in einem Becherglas in ca. 120 mL deionisiertem Wasser gelöst. Durch Zugabe von Salzsäure (32 %) wird der pH-Wert auf 7,8 eingestellt (ca. 2 mL). Anschließend wird die Lösung in einen 200 mL Messkolben überführt und mit deionisiertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt (pH-Wert überprüfen und wenn nötig korrigieren). Die Lösung wird zur Bereitung der Acetylcholinesterase-Lösung frisch hergestellt.

- Acetylcholinesteraselösung

Der Inhalt der Acetylcholinesterase aus Zitteraal (2000 U/Gläschen) wird komplett in einem 200 mL Messkolben in TRIS/HCl-Puffer, pH 7,8 gelöst. Danach werden zur Stabilisierung der Enzymaktivität auf der stationären Phase der HPTLC-Platte 0,19 g (ca. 0,1 %) Rinderserumalbumin (BSA) zugefügt. Anschließend wird mit TRIS/HCl-Puffer bis zur Markierung aufgefüllt. Diese Lösung ist 6 Monate stabil und wird im Kühlschrank bei 4 - 7 °C gelagert. Beim Auftreten von mikrobiellen Verunreinigungen (z.B. Ausbildung von Schlieren oder Fäden) wird die Lösung steril-filtriert.

- Substratlösung

100 mg Indoxylacetat werden in ein 5 mL Reaktionsgefäß eingewogen und mit 5 mL Methanol gelöst. Bei Lagerung im Kühlschrank bei 7 °C kann die Lösung 1 Woche verwendet werden. Eine leichte Färbung der Lösung stört die Detektion nicht.



Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung

Die Voraussetzung für ein reproduzierbares Ergebnis ist die exakte Einhaltung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Schritte bis zur Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung. In Abbildung 6-2 ist eine Übersicht der einzelnen Schritte mit dem Zeitpunkt ihrer Durchführung gegeben. Die Detektion startet mit dem Tauchen der Platte in die Acetylcholinesterase-Lösung. Danach erfolgt eine Inkubationsphase von 5 min (37 °C), bevor die Platte in den Derivatisierungsautomaten gelegt wird. Das Auftragen des Substrates startet zum Zeitpunkt 5:30 min nach dem Tauchen der Platte. Zur Entfernung des restlichen Substrat-Aerosols, wird die Verneblungskammer des Derivatisierungsautomaten zum Zeitpunkt 6:15 min entlüftet. Dies wird bei 6:45 min gestoppt und die HPTLC-Platte aus der Verneblungskammer entnommen und zur Fotodokumentation transportiert. Die Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung erfolgt zum Zeitpunkt 8:30 min nach dem Tauchen der Platte.



Abbildung 6-2: Überblick über den zeitlichen Ablauf des Acetylcholinesterase-Hemmtests



- Tauchen der HPTLC-Platte

Die Acetylcholinesterase-Lösung wird kurz vor dem Tauchen aus dem Kühlschrank (4 – 7 °C) genommen. Damit Substanzen bis zu einer Plattenhöhe von 80 mm erfasst werden, muss die Tauchkammer bis zur Markierung mit der AChE-Lösung befüllt werden. Für den Tauchvor-gang wird die Tauchdauer auf 1 s und die Tauchgeschwindigkeit auf 5 cm/s eingestellt. Mit dem Tauchen der Platte startet die Zeiterfassung. Nach dem Tauchvorgang wird die HPTLC-Platte auf einem Papiertuch abgelegt und die überstehende Lösung mit einem Gummiwischer (Fensterabzieher) abgezogen. Die auf der Rückseite verbleibende Suspension wird abgewischt. Mit dem Eintauchen der Platte wird die Zeit gestoppt. Zur Inkubation bei 37 °C wird die HPTLC-Platte in ein luftdichtes Behältnis gegeben. Für den Erhalt der Luftfeuchtigkeit ist der Boden des Behälters mit wenigen mL Wasser bedeckt. Die Platte liegt auf einem Gitter über Wasser. Es ist darauf zu achten, dass die Platte nach dem Tauchen nur noch waagerecht transportiert wird. Zum Zeitpunkt 5 min nach dem Tauchen der Platte wird die Platte aus dem Inkubationsschrank genommen.

- Aufgabe des Substrates

Nach der Inkubationszeit wird die Platte aus der Inkubationsbox entnommen und auf den Plattenträger des Derivatisierungsautomaten platziert. Für die Aufgabe des Substrats sind die Parametereinstellungen wie in Tabelle 4 angegeben zu wählen.

Parameter	Einstellung
Düse	Grün
Sprühstufe	5
Substratvolumen	600 µL

Nach dem Auftragen des Substrates wird die Platte zum Visualizer transportiert und 8:30 min nach dem Tauchen der Lösung in die Acetylcholinesterase-Lösung wird die Aufnahme der Bildsequenz gestartet. Aktive Acetylcholinesterase setzt das Substrat zu einem blau fluoreszierenden Stoff um, d.h. Stellen an denen die Acetylcholinesterase gehemmt ist erscheinen dunkel.



- Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung

Die Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung erfolgt im TLC-Visualizer bei 366 nm. Es werden 10 Bilder im Abstand von 1 min mit einer Belichtungszeit von mindestens 200 ms (je nach Alter der Acetylcholinesterase-Lösung) aufgenommen. Sobald eine Belichtungszeit von 350 ms benötigt wird, um ein ausreichend helles Bild zu bekommen, wird die Enzymlösung neu hergestellt.

Zur Auswertung wird für eine Vergleichbarkeit der Proben das dritte aufgenommene Bild verwendet. Da bei 366 nm fluoreszierende Substanzen die Auswertung stören können, wird nach 49 min seit dem Tauchen in die AChE-Lösung ein Bild im Weißlicht im Remissionsmodus aufgenommen. Hier erscheinen hemmende Substanzen als weiße Banden vor einem blauen Hintergrund. Zusätzlich kann die Platte noch bei 670 nm gescannt werden. Zur Vermeidung von negativen Peaks, wird beim TLC Scanner 4 unter Measurement mode die Fluoreszenz ausgewählt.

Qualitätssicherung

Nr.	Substanz	CAS	Konzentration in ng/µL	log K _{ow}
1	1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure	86-66-8	10	
2	1,5-Naphthalindisulfonsäure	81-04-9	10	
3	1-Naphthalinsulfonsäure	85-47-2	10	
4	Thioharnstoff	62-56-6	10	-0,95
5	Theobromin	83-67-0	10	-0,52
6	Coffein	58-08-2	10	-0,07
7	Acetanilid	103-84-4	10	1,16
8	Benzanilid	93-98-1	10	3,07
9	Dimethylgelb	60-11-7	10	4,14

Tabelle 6-2: Zusammensetzung Chromatographiekontrollmix (Auftragevolumen 30 µL)



Nr.	Substanz	CAS	Konzentration in ng/µL
1	Paraoxon-ethyl	311-45-5	1
2	Theobromin	83-67-0	15
3	Coffein	58-08-2	15

Tabelle 6-3: Referenzsubstanzen Acetylcholinesterase-Hemmtest (Auftragevolumen 20 µL)

6.2 HPTLC-Trennung

6.2.1 AMD - Fingerprint

- HPTLC-Platten

Platte:HPTLC LiChrospher Kieselgel 60 F254s (Merck)Vorreinigung:zweimaliges Tauchen der Platten für jeweils min. 20 min in 2-
Propanol. Trocken der Patte bei 120°C, danach vorentwickeln der
Platte mit Acetonitril und nochmaliges Trocken bei 120°C. Lage-
rung der Platten bis zur Verwendung in einem von der Raumluft
abgeschlossenen Glasbehälter.



Tabelle 6-4: Gradient AMD

Stufe	ACN:HCOOH 100:0.1	CH ₂ Cl ₂	n-Hexan	Migrations- distanz	Trocknungs- zeit
1	35.0 Vol %	65.0 Vol %	0.0 Vol %	11.0 mm	4.0 min
2	35.0 Vol %	65.0 Vol %	0.0 Vol %	11.0 mm	4.0 min
3	35.0 Vol %	65.0 Vol %	0.0 Vol %	11.0 mm	4.0 min
4	30.0 Vol %	70.0 Vol %	0.0 Vol %	16.3 mm	4.0 min
5	20.0 Vol %	80.0 Vol %	0.0 Vol %	21.6 mm	4.0 min
6	18.0 Vol %	82.0 Vol %	0.0 Vol %	26.9 mm	4.0 min
7	16.0 Vol %	84.0 Vol %	0.0 Vol %	32.2 mm	4.0 min
8	14.0 Vol %	86.0 Vol %	0.0 Vol %	37.5 mm	4.0 min
9	12.0 Vol %	88.0 Vol %	0.0 Vol %	42.8 mm	4.0 min
10	10.0 Vol %	90.0 Vol %	0.0 Vol %	48.2 mm	4.0 min
11	8.0 Vol %	92.0 Vol %	0.0 Vol %	53.5 mm	4.0 min
12	6.0 Vol %	94.0 Vol %	0.0 Vol %	58.8 mm	4.0 min
13	4.0 Vol %	96.0 Vol %	0.0 Vol %	64.1 mm	4.0 min
14	2.0 Vol %	98.0 Vol %	0.0 Vol %	69.4 mm	4.0 min
15	0.0 Vol %	100.0 Vol %	0.0 Vol %	74.7 mm	4.0 min
16	0.0 Vol %	50.0 Vol %	50.0 Vol %	80.0 mm	4.0 min





Abbildung 6-3: Gradient AMD

- SPE	
-------	--

pH-Wert SPE:	7
Anreicherungsvolumen:	1000 mL, KA Ablauf 200 mL
Extraktvolumen:	1 mL
SPE-Material:	Agilent Plexa (500 mg, 6 mL)
Blindprobe:	SPE-Kartuschenblindprobe
Konditionieren:	MeOH, MeOH/EtAc 1:1, CH2Cl2
Elution:	4 mL MeOH, 4 mL MeOH/EtAc 1:1, 2 mL CH2Cl2
Elution: 2 Kartusche:	4 mL MeOH/EtAc 1:1



- HPTLC-Platten

Platte: NP, Kieselgel 60 F254, 200 µm (Merck, Darmstadt)

- Vorreinigung: zweimaliges Tauchen der Platten für jeweils mind. 20 min in 2-Propanol. Trocken der Patte bei 120°C, danach vorentwickeln der Platte mit Acetonitril und nochmaliges Trocken bei 120°C. Lagerung der Platten bis zur Verwendung in einem von der Raumluft abgeschlossenen Glasbehälter.
- Fließmittel

Fließmittel: H2O:ACN 63:37 mit 250 mM NaCl

Da HILIC-Methoden sehr empfindlich auf geringe Konzentrationsunterschiede reagieren, muss die NaCl-Stammlösung eingewogen werden.

 Stammlösung: 500 mM NaCl-Lösung in H2O (5,84 g NaCl auf 200 g H2O, 2,9 % Massenanteil (NaCl, Dichte bei 20 °C 1,0189 g/mL)

2.) Fließmittel: 15 mL der wässrigen NaCl Lösung auf 12 mL ACN ($\sigma = 0,78$ g/mL) (20 °C)

- Referenz

Polare Chromatographie-Kontrolle:

Mix aus Galantamin, Neostigmin, Donepezil: Konzentration jeweils 10 ng/ μ L

Auftragung
 Auftrageposition y-Richtung:
 Auftragezone:
 Kontrolle:

10 mm Bandförmig, Bandenlänge 6 mm Polare Chromatographie-Kontrolle (5 μL)

- Trennbedingungen

Für Proben mit Matrixbelastung sind 2 Entwicklungsschritte notwendig

Trennung 1 (Matrix entfernen)	
Fließmittel:	MeOH/ACN (10:90, v:v)
Fließmittel nur in Stutzen für den	Entwicklungstrog einfüllen, kein Filterpapier für
Kammersättigung notwendig	
Kammersättigung:	0 s
Luftfeuchtigkeitseinstellung:	0 s
Vorkonditionierung:	0 s
Ende der Fließmittelfront:	80 mm
Trocknungszeit:	15 min

Trennung 2 (Trennung polare Substanzen)			
Fließmittel:	H ₂ O:ACN 63:37 mit 250 mM NaCl (siehe 1.2)		
10 mL für Entwicklung, 20 mL für Kammersättigung (inkl. Filterpapier)			
Kammersättigung:	20 min		
Luftfeuchtigkeitseinstellung:	10 min (NaCl-Lsg. mit 0,450 g/L für)		
Vorkonditionierung:	0 s		



Ende der Fließmittelfront:	70 mm
Trocknungszeit:	17 min
Spülen mit:	H ₂ O und anschließend mit Acetonitril



6.3 Qualitätssicherung

Abbildung 6-4: Darstellung der Stabilität der Rf-Werte über einen Zeitraum von 2016 - 2021

6.4 HPLC-HRMS Methode

Die Wasserproben wurden mit einem Flüssigkeitschromatographie-System (LC20 Se-ries, Shimadzu, Nakagyoku, Japan) gekoppelt an ein hochauflösendes Q-TOF/MS (Trip-le-TOF® 5600 System, Sciex, Framingham, USA) mit Elektrospray-Ionisation analysiert (HPLC-HRMS). Als Trennsäule kam eine C18-Umkehrphasen-Säule zum Einsatz, welche auf 40 °C temperiert wurde. Zum Schutz der analytischen Säule wurde zusätzlich eine C18-Vorsäule verwendet. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min. Als Eluenten wurden Wasser und Acetonitril jeweils unter Zusatz von 0,1 % (v/v) Ameisensäure verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels eines mehrstufigen Gradientenprogramms bei einer Direktinjektion von 100 μ L der wässrigen Probe (anreicherungsfrei). Die massenspektrometrische Detektion erfolgte in zwei getrennten Läufen, im positiven und negativen Ionisationsmodus (ESI+/-), wobei Ionen



im Scan-Modus zwischen m/z 100 - 1200 erfasst wurden. Die externe Kalibrierung des Massenanalysators erfolgte automatisch (Calibrant Delivery System) nach jedem fünften Lauf, während eine interne Kalibrierung mit bekannten Verunreinigungen kontinuierlich durchgeführt wurde. Die Quellenparameter wurden auf den analytischen Fluss angepasst eingestellt. Zusätzlich wurden Fragmentionen-Spektren im Massenbereich von m/z 30 - 1200 von maximal 12 Vorläuferionen pro Zyklus aufgenommen (DDA, Data-dependant acquisition). Die intensivsten Massen aus dem Survey-Scan, welche sich nicht auf einer Ausschlussliste befanden, wurden im selben Zyklus als Precursor-Ionen selektiert um automatisiert MS²-Spektren aufzuzeichnen. Isotope wurden im Abstand von 4 Da von der Fragmentierung ausgeschlossen und Vorläufer-Ionen nach 8 Fragment-Spektren für 20 Sekunden ignoriert.

Um falsch-positive Befunde bei der Auswertung zu minimieren, wurde nach dem Peak Finding und Peak Alignment (MarkerViewTM, Sciex) jedes Feature durch einen Integrationsalgorithmus (MultiQuantTM, Sciex) integriert. Neben der Response können hierdurch weitere Kenngrößen wie Peakhöhe, Peakfläche und Peakbreite zur Korrektur falsch-negativer Befunde (nur teilweise erkannte Feature) herangezogen werden. Um potentielle falsch-positiv-Befunde zu filtern, wurden beim Thresholding weitere wichtige Kriterien festgelegt. Zum einen wurden Feature, welche sich vom Blindwert nicht signifikant unterscheiden eliminiert, zum anderen mussten definierte minimale Peakhöhen bzw. Peak-flächen überschritten werden. Basierend auf der Chromatographie wurde ein Fenster für die minimale und maximale Peakbreite gesetzt. Die Analyse von Duplikaten ermöglicht außerdem die relative Schwankung der jeweiligen Größen zu berücksichtigen und Feature, welche nicht erklärbare Schwankungen aufweisen, zu eliminieren. Der Datensatz wurde anschließend um Isotope, Addukte (z. B. [M+Na]⁺), Dimere (z. B. [2M+H]⁺) und In-Source-Fragmente (z. B. [M-H2O+H]⁺) basierend auf exakter Masse und Retentionszeit reduziert (Bader et al. 2016).



Fachlicher Abschlussbericht zum BMBF-Verbundprojekt NeuroBox: Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf, Teilprojekt 6

Zuwendungsempfänger:	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ			
	Department Bioanalytische Ökotoxikologie (BIOTOX)			
	Permoserstraße 15	, 04318 Leipzig		
Förderkennzeichen: 02WRS	1419F			
Teilprojekt 6:	"Identifizierung u	nd toxikologische	Charakterisierung	neuroaktiver
	Substanzen und	Gemische in	Oberflächenwässer	n als Beitrag
	zum Trinkwasserre	ssourcenschutz"		
Teilprojektleiter:	Dr. Eberhard Küste	r		
Projektbearbeitung:	PD Dr. Werner Br	ack, Dr. Riccardo	Massei, Afolarin O.	Ogungbemi,
	Dipl. Ing. FH Silke A	ulhorn		
Projektlaufzeit:	1.3.2017 bis	31.12.2020		
Bericht erstellt:	06.2021			

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis
I. Kurze Darstellung
I. 1. Aufgabenstellung
I. 2. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde 4
I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens5
I. 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde6
I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen
II. Eingehendere Darstellung
II.1. Erzielte Ergebnisse
II. 2. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit
II.3. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses. 9
II. 4. Während der Durchführung des FE-Vorhabens dem AN bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen
II. 5. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Teilprojektes
Anlagen:
Anlage 1: Erfolgskontrollbericht TP6 12

I. Kurze Darstellung

I. 1. Aufgabenstellung

Das Teilvorhaben TP6 hatte zum Ziel, mittels einer Weiterentwicklung der in "Tox-Box"-Verbund entwickelten Teststrategie anthropogene Spurenstoffe zu erfassen und diese auch hinsichtlich ihrer Neurotoxizität mittels Fischembryotest zu erfassen und zu bewerten. Durch die Nutzung neuer ökotoxikologischer Endpunkte im Fischembryotest sollte die Wirkung von neuroaktiven Substanzen auf diese wichtige Gruppe der aquatischen Organismen analysiert und eine Nutzung für das Management von neuroaktiven Umweltkontaminanten identifiziert werden.

Die Anzahl der bislang auf Neurotoxizität untersuchten Umweltchemikalien ist gering, sodass eine Diskrepanz zwischen der Anzahl der eingesetzten Substanzen und dem Wissen zu deren neurotoxischem Risiko besteht. Neuroaktive Substanzen sind infolge ihres ubiquitären Vorkommens auch von ökologischer Relevanz und beeinflussen beispielsweise die Reproduktion von Fischen und Wirbellosen. Der Zebrabärblingsembryo (*Danio rerio*) als Modellorganismus für die Beurteilung des toxischen Potenzials von Chemikalien bei Säugetieren, inklusive des Menschen, bietet die Möglichkeit Entwicklungstoxizität und Neurotoxizität in einem einzigen Testverfahren zu kombinieren. Hierfür müssen jedoch noch die genaue Eignung und die Grenzen von Embryonen des Zebrabärblings als Neurotox-Screening-Modell untersucht werden, welches ebenfalls das Ziel dieses Teilprojektes war.

Da die zu untersuchenden Proben immer auch als Mischungen einen Vielzahl von neuroaktiven Substanzen angesehen werden muß, sollte die Analyse von Mischungen im Teilprojekt 6 eine Verbesserung der bisherigen Einzelstoffbewertung darstellen, da die toxische Wirkung einzelner Substanzen in Mischungen maskiert oder auch verstärkt sein können. Durch eine zielgerichtete Extraktion und chromatographische Fraktionierung der Extrakte zur Reduktion der Komplexität sowie nachfolgender chemischer und biologischer Analytik (wirkungsbezogene Analytik (WBA), englisch: Effect-directed analysis (EDA) sollten einzelne, dominante Substanzen mit einem spezifischen Schädigungspotenzial isoliert und identifiziert werden. Deswegen sollte sich das TP 6 auch unter anderem mit der Identifizierung und toxikologischen Charakterisierung neuroaktiver Verbindungen aus wässrigen Umweltproben und von Mischungen unter Berücksichtigung der Mischungseffekte "Konzentrationsadditivität" bzw. "unabhängige Wirkung" beschäftigen, indem sich Methoden der wirkungsorientierten Analytik und der differentiellen Analyse bedient wird und Zebrabärblingsembryonen verwendet werden. Ein weiterer Bestandteil des TP 6 war das Ziel Untersuchungen zur Biotransformation neuroaktiver Substanzen im Zebrabärblingsembryo durchzuführen. Insgesamt sollte diese Erweiterung der Analyse mit dem Zebrabärblingsembryo neben einer langfristigen Reduzierung von Tierversuchen auch mittelfristig für eine Identifikation von neuroaktiven Substanzen in der aquatischen Umwelt nutzbar sein.

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde

Das Forschungs- und Entwicklungsvorhaben NeuroBox – Teilprojekt 6 widmete sich der Einzel- und Mischungsanalyse von neuroaktiven Substanzen mit Embryonen des Zebrabärblings und der Identifikation von einzelnen herausragend toxischen Substanzen aus Umweltproben mittels EDA.

Das Teilprojekt basierte auf bisherigen Arbeiten mit Zebrabärblingsembryonen und der Erweiterung von den klassischen sogenannten letalen und subletalen Auswerteendpunkten auf neue Analysen bzw. Endpunkte. Dabei wurde besonders auf Vorarbeiten aufgebaut, die die Bewegungsanalysen von sich entwickelnden Zebrabärblingsembryonen beinhalteten.

Wichtige Vorarbeiten sind unter anderem mit folgenden Veröffentlichungen dokumentiert (Autoren, die am TP 6 teilnehmen sind **fett** markiert):

- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., • Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., López Herráez, D., Miège, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Rüdel, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P., van Gils, J., van Wezel, A.P., Dick Vethaak, A., Vermeirssen, E., von der Ohe, P.C., Vrana, Β., (2017): Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources Sci. Total Environ. 576 , 720 – 737
- Kühnert, A., Vogs, C., Seiwert, B., Aulhorn, S., Altenburger, R., Hollert, H., Küster, E., Busch, W.,
 Biotransformation in the zebrafish embryo temporal gene transcription changes of cytochrome P450 enzymes and internal exposure dynamics of the AhR binding xenobiotic benz[a]anthracene
 Environ. Pollut. 230, 1 11
- Teixido, E., Kießling, T., Leuthold, D., Scholz, S., (2017): <u>Effect signatures in zebrafish embryos exposed to compounds with potential developmental</u> <u>toxicity</u> *Reprod. Toxicol.* 72, 49
- Välitalo, P., Massei, R., Heiskanen, I., Behnisch, P., Brack, W., Tindall, A.J., Du Pasquier, D., Küster, E., Mikola, A., Schulze, T., Sillanpää, , (2017): <u>Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment</u> *Water Res.* 126, 153 – 163

- Massei, R., Busch, W., Wolschke, H., Schinkel, L., Bitsch, M., Schulze, T., Krauss, M., Brack, W., (2018):
 <u>Screening of pesticide and biocide patterns as risk drivers in sediments of major European river mouths: ubiquitous or river basin-specific contamination?</u> Environ. Sci. Technol. 52 (4), 2251 – 2260
- Teixido, E., Kerkhof, O., Kießling, T., Scholz, S., (2018): <u>Retrieving mode of action information by automated effect pattern analysis using the</u> <u>zebrafish</u> <u>embryo</u> <u>toxicity</u> <u>test</u> *Reprod. Toxicol.* 80, 18 – 19
- Leuthold, Klüver, Altenburger, Busch, W., (2019): D., N., R., Can environmentally relevant neuroactive chemicals specifically be detected with the locomotor response test in zebrafish embryos? Environ. Sci. Technol. 53 (1), 482 - 493

und umfassen den Bereich der Einzel- und Mischungsanalyse von Substanzen, der Analyse von Biotransformation in Fischembryonen, der Bewegungsanalyse von verschiedenen Entwicklungsstadien von Zebrabärblingsembryonen und der Untersuchung von Abwässern mit dem Fischembryotest. Als weitere Voraussetzung zur Durchführung des Vorhabens kann die Etablierung des Fischembryotests (FET) für das Monitoring von Umweltproben gesehen werden. Der FET ist in Deutschland seit längerem für Untersuchungen im Rahmen der Abwasserabgabenverordnung anstelle von akuten Fischtests vorgeschrieben und wird auch als geeigneter Modellorganismus vor allem von potentiellen Langzeiteffekten angesehen. Dabei ist zukünftig mit einer noch stärkeren Anwendung zu rechnen.

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Arbeiten im Teilprojekt wurden in 3 Teilaufgaben (TA) aufgeteilt, die aufeinander aufbauend bearbeitet werden sollten.

TA 1. Wirkungsorientierte Analytik neuroaktiver Verbindungen in Oberflächenwässern;

Verwendung des Zebrabärblingsembryotests für die Differentialanalyse der Wirkung; Probenahmen mittels Large Volume Solid Phase Extraction (LVSPE); Untersuchung der LVSPE-Extrakte auf ihre neuroaktive Wirkung und Fraktionierung mittels RP-HPLC; Screening der Fraktionen auf embryotoxische Wirkung und bei Positivreaktionen Untersuchung im Fischembryotest (gegebenenfalls nach einem weiteren Fraktionierungsschritt) mit Hilfe differentialdiagnostischer

Verfahren auf spezifisch neuroaktive Wirkungen; Identifizierung wirksamen Substanzen mittels Target- und Non-Target-Analysenverfahren (LC-HRMS/MS und GC-HRMS/MS) in Kombination mit Computerprogrammen zur Vorhersage von Retention, Ionisierung, Fragmentierung etc. (Hauptaufgabe des Dept. Wirkungsorientierte Analyse)

TA 2. Analyse der Mischungstoxizität;

Modellierung der Mischungstoxizität von in den Wasserproben identifizierten ähnlich und unähnlich wirkenden neuroaktiven Substanzen (beinhaltet die Erstellung und Testung von Mischungen, die aus - nach Stand des Wissens- ähnlich oder unähnlich wirkenden Substanzen bestehen); Auswertung/Bewertung der Ergebnisse in Bezug zum GOW- Konzept; Parallelanalytik der Realkonzentrationen in der Mischungsanalyse (garantiert die Qualität der Ergebnisse in Bezug auf umweltrelevante Konzentrationen): (Hauptaufgabe des Dept. Bioanalytische Ökotoxikologie)

TA 3. Quantifizierung der internen Dosis von Einzelsubstanzen und deren Mischungen

Bestimmung eines möglichen Einflusses der Biotransformation auf die beobachteten Effekte in den Bewegungsmusteranalysen; in ausgewählten Fällen analytische Überprüfung der Kinetik und internen Konzentration der Testsubstanzen; Untersuchung des Einflusses der Biotransformation über die Analyse der bekannten oder vermuteten Transformationsprodukte (Hauptaufgabe des Dept. Bioanalytische Ökotoxikologie)

Dabei wurden die beiden ersten Teilaufgaben erfolgreich abgeschlossen, die Teilaufgabe 3 konnte nur zum Teil abgeschlossen werden, da sich die Etablierung der Mischungsanalysen länger als erwartet hinauszögerte.

I. 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1. Wissenschaftlicher Stand

Unter Punkt I.2 sind einige der im Department Bioanalytische Ökotoxikologie veröffentlichten Manuskripte erwähnt, welche den aktuellen wissenschaftlichen Stand zu Beginn des Projekts darstellen und auf welche die Arbeiten im Projekt aufbauten. Als zusätzliche Informationsquellen wurden öffentlich zugängliche Datenbanken genutzt. Diese dienten zum einen der Modellierung von Wasserlöslichkeiten, der sogenannten logKow- abhängigen Basistoxizität oder auch der Identifikation von biochemischen Reaktionspfaden ("pathways").

2. Technischer Stand

Der gegebene technische Stand in den verschiedenen Bereichen zu Beginn des Projekts ist im Folgenden aufgelistet:

- etablierte Verfahren zur Analytik von organischen Substanzen im Labor mittels HPLC- MS und GC-MS Verfahren;
- etablierte Zebrabärblingskultur (Danio rerio);
- departmentinterne SOP f
 ür Zebrab
 ärblingsembryotest (routinem
 ässig f
 ür das Monitoring von Umweltproben im Labor durchgef
 ührt);
- ein etabliertes Verfahren zur Analyse der Bewegungsänderung von Zebrabärblingsembryoen (LMR).
- 3. Angabe der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Zur Literaturrecherche wurden folgende Internetseiten genutzt: Web of Knowledge, Pubmed, Google Scholar sowie:

- AnimAlt-ZEBET - Datenbank für Alternativmethoden zu Tierversuchen.

I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes erfolgte mit dem Department Wirkungsorientierte Analytik des UFZ und zum Teil mit anderen Teilprojekten (TP5 & TP 3). Dabei handelte es sich zum einen um gemeinsame Probennahmen und die Organisation und Durchführung eines Ringtests.

Zusätzlich gab es eine Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt. Hier handelte es sich u.a. um Anpassungen des Fischembryotest im Rahmen eines deutschlandweiten Monitorings (Kleingewässermonitoring <u>https://www.ufz.de/kgm/index.php?de=44480</u>), UFZ Pressemitteilung (<u>https://www.ufz.de/index.php?de=36336&webc_pm=33/2021</u>) von Kleingewässern an landwirtschaftlich genutzten Flächen, die auch von neurotoxischen und neuroaktiv wirkenden Pestiziden belastet werden. Das Know-how aus diesem Monitoring wurde direkt genutzt für die Analyse der Umweltproben und diente auch der Feinjustierung der Einzelstofftestung für die Untersuchung der Bewegungsänderungen durch neuroaktive Substanzen durch den Mitarbeiter A. Ogungbemi.

II. Eingehendere Darstellung

II.1. Erzielte Ergebnisse

Die Hauptergebnisse mit einer detaillierten Diskussion sind in den 6 Veröffentlichungen von Legradi et al., Massei et al. und Ogungbemi et al. zusammengefasst (s. unten). Nach einem Review zum Problem der Analyse von Neurotoxizität in Umweltproben (Legradi et al., 2018) wurde eine weitere Veröffentlichung publiziert, die die derzeitigen Erkenntnisse aus der wissenschaftlichen Literatur zu Bewegungsanalysen mit Fischembryonen und Fischlarven des Zebrabärblings für die Analyse von Umweltproben mit neuroaktiven Verunreinigungen darstellt (Ogungbemi et al., 2019). Massei et al. (2019) untersuchten Umweltproben mit dem im Teilprojekt entwickelten Methode der Kombination von Bewegungsanalysen älterer Fischembryonen bzw. Eleutheroembryonen und der Messung der Cholinesteraseaktivität zur Bewertung. Darauf folgend sind zwei Publikationen von Ogungbemi et al. veröffentlicht worden, die die Methode der Messung von Bewegungsänderungen in sehr frühen Stadien darstellen und es einer breiteren wissenschaftlichen Öffentlichkeit erleichtern sollen, diese Methode zu etablieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Einfachheit und kostengünstige Technik und Auswertung gelegt, um die Nutzung dieser Methode für viele Laboratorien verfügbar und nutzbar zu machen. Zur Analyse der frühen Spontanbewegungen der Fischembryonen und auch anderen Organismen reichen im Grunde Petrischalen für die Exposition, ein einfaches Binokular mit angeschlossener Kamera zum Auswerten und Filmen der Spontanbewegungen und für die halbautomatische Auswertung der Filme die offen zugängliche und kostenfreie KNIME Software aus (https://www.knime.com/). Die letzte Veröffentlichung beschäftigte sich mit dem Problem der Mischungstoxizität und der Nutzungsmöglichkeiten der STC-Methode (Untersuchung der Spontanbewegungen von Fischembryonen im Alter bis zu 27 h nach Befruchtung) bei der Analyse von Umweltproben mit Kontamination durch neuroaktive Substanzen.

II. 2. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Zuwendung finanzierte im Wesentlichen die Personal- und Reisekosten zu Tagungen von Afolarin O. Ogungbemi zur Entwicklung und Nutzung der STC-Methode zur Analyse von Einzelstoffen und Umweltproben und die Personalkosten von Dr. Riccardo Massei. Die Summe der Verbrauchsmittel wurden hauptsächlich für die Analyse von Umweltproben, inklusive Chemikalienstandards für Kalibrierung und Quantifizierung von neuroaktiven Substanzen in Umweltproben und für die Extraktion bzw. Probenaufbereitung genutzt. Diese Arbeiten von Herrn Massei bildeten die wesentliche Grundlage für die Arbeiten von Herrn Ogungbemi und die daraus resultierenden Publikationen. Ohne eine differenzierte Analyse der zur Verfügung stehenden und gestellten Umweltproben wäre es nicht möglich gewesen, umweltrelevante neuroaktive Chemikalien zu identifizieren und sie in den Einzelstoff- und Mischungsanalysen zu nutzen.

II.3. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses

Stichwort: Verwendung der STC- Methode zur wirkungsbasierten Analyse und Priorisierung von Umweltproben

Umweltproben bestehen in den meisten Fällen aus einer Mischung vieler Substanzen. Zur Identifikation von neuroaktiven Substanzen, die eine besonderes Risiko für Nichtziel-Organismen sind, wäre nach den Ergebnissen aus diesem Teilprojekt ein Einsatz der STC- Methode mit den Fischembryonen möglich. Eine Hyperaktivität der Fischembryonen nach einer Belastung durch eine Umweltprobe würde auf eine potenzielle Verstärkung neuronaler Effekte hinweisen, während beobachtete Hypoaktivität auf potenziell hemmende Effekte deuten würde. Diese Hyper- und Hypoaktivitätsinformationen könnten dann in weiteren Screenings und Priorisierungsverfahren mit Hilfe der EDA verwendet werden. Die Identifizierung dominanter Wirkmechanismen und damit letztendlich von besonders kritischen Substanzen wäre möglich.

Nach den Erfahrungen aus dem Teilprojekt ist es allerdings ebenfalls möglich, bei der Untersuchung von Umweltproben mit dem STC-Test keinerlei Effekt zu beobachten, wenn sich Kontaminanten gegenseitig in ihrer Wirkung von Hyper- und Hypoaktivität aufheben. Dies könnte zu einer Herausforderung für die diagnostische Risikobewertung werden. Eine Lösung bestände darin, komplexe Mischungen mit einer Positivkontrolle zu spiken, so dass Abweichungen von der bekannten Effektgröße der Positivkontrolle ein Hinweis auf eine inhärente Wirkung der Mischung sein könnten.

Es ist sicher, dass der STC- Test und andere ähnliche Verhaltenstests ein großes Potenzial für den Einsatz als wirkungsbasierte Methoden haben, um eine Überwachung von Umweltproben z.B. aus Kläranlagenabwässern zu vereinfachen bzw. zielführend eine Priorisierung zu ermöglichen und das Risiko von neuroaktiven Verunreinigung in Zukunft zu verringern. Diese Priorisierung von Proben wird derzeit mit Proben aus einer weiteren Monitoringkampagne (Joint Danube Survey 4 <u>http://www.danubesurvey.org/jds4/about</u> noch überprüft und getestet.

II. 4. Während der Durchführung des FE-Vorhabens dem AN bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Von Arbeitsgruppen aus dem Ausland sind aktuell Ergebnisse veröffentlicht worden, die die diversen Verhaltensanalysen mittels Fischembryonen und Fischlarven zusammenfassen (Fitzgerald et al., 2021, 40(4), 989ff, ET&C, DOI: 10.1002/etc.4951) oder diese für die Analyse von Pharmazeutika nutzen (Hong et al. 2021, 771 (1), Science of The Total Environment, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145450).

Dabei ist bei diesen und auch bei anderen Arbeiten (die von Ogungbemi et al. in der Veröffentlichung von 2019 aufgelistet sind) zu erkennen, das im Augenblick noch diejenigen Verfahren der Verhaltensanalysen bevorzugt werden, die zu späteren Stadien bzw. Zeitpunkten gemessen werden (also PMR oder auch LMR, aber seltener die STC-Methode). Bei den Methoden der PMR und LMR sind allerdings Analysengeräte nötig, die teuer sind und deswegen nicht von einer breiten wissenschaftlichen Öffentlichkeit genutzt werden können bzw. werden. Um die STC-Methode weiter zu verbreiten, arbeiten wir derzeit an einer weiteren Veröffentlichung, die die Nutzbarkeit für die Identifikation von neuroaktiven Substanzen in Umweltproben darstellt und in einem Monitoring einsetzbar sein soll. E. Küster ist Teilnehmer in einem von der AquaticPollutants Joint Transnational Call finanzierten Projekt http://www.waterjpi.eu/joint-calls/joint-call-2020-aquaticpollutants (JPI_NATURE, Beginn Sept. 2021) in dem der im Neuroboxprojekt entwickelte Test für die Analyse von Abwässern aus Pflanzenkläranlagen und Rohwässern genutzt werden soll. Damit ist eine Fortführung und Weiternutzung der Erkenntnisse und Produkte aus dem Neuroboxprojekt gewährleistet.

II. 5. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Teilprojektes

Erfolgte Veröffentlichungen

Legradi, J.B., Di Paolo, C., Kraak, M.H.S., van der Geest, H.G., Schymanski, E.L., Williams, A.J., Dingemans, M.M.L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M.-L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B.I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S.H., Pollet, D., Waldmann, P., Kienle, C., Werner, I., Haigis, A.-C., Knapen, D., Vergauwen, L., Spehr, M., Schulz, W., Busch, W.,
Leuthold, D., Scholz, S., vom Berg, C.M., Basu, N., Murphy, C.A., Lampert, A., Kuckelkorn, J., Grummt, T., Hollert, H., (2018): An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment, *Environ. Sci. Eur.* 30, art. 46, <u>https://doi.org/10.1186/s12302-018-0173-x</u>

Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., Küster, E., (2019): <u>Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how</u> <u>experimental parameters impact the predictability of behavior changes</u>, *Environ. Sci. Eur.* **31**, art. 88, <u>Volltext (DOI)</u>

Massei, R., Hollert, H., Krauss, M., von Tümpling, W., Weidauer, C., Haglund, P., Küster, E., Gallampois, C., Tysklind, M., Brack, W., (2019):

Toxicity and neurotoxicity profiling of contaminated sediments from Gulf of Bothnia (Sweden): a multi-endpoint assay with zebrafish embryos

Environ. Sci. Eur. 31, art. 8

Ogungbemi, A.O., Teixido, E., Massei, R., Scholz, S., Küster, E., (2020): <u>Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the</u> <u>zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®</u> <u>Neurotoxicol. Teratol.</u> **81**, art. 106918, <u>Volltext (DOI)</u>

Ogungbemi, A.O., Massei, R., Altenburger, R., Scholz, S., Küster, E., (2021): <u>Assessing combined effects for mixtures of similar and dissimilar acting neuroactive substances on</u> <u>zebrafish embryo movement</u>, *Toxics* **9** (5), art. 104 <u>Volltext (DOI)</u>

Ogungbemi, A.O., Teixido, E., Massei, R., Scholz, S., Küster, E., (2021): <u>Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior</u> <u>endpoint using a workflow in KNIME</u> <u>MethodsX 8</u>, art. 101330, <u>Volltext (DOI)</u>

Geplante Veröffentlichungen

Dr. Arbeit von Afolarin O. Ogungbemi: zum Zeitpunkt des Abfassens dieses Berichtes bereits bei der Uni Koblenz-Landau zur Begutachtung eingereicht.

Ogungbemi et al. : Differential mechanisms of action of chlorpyrifos and its oxon-metabolite in early stages of zebrafish embryos: implications of biotransformation capacity

Massei, Ogungbemi et al.: Application of zebrafish embryo behavior tests as effect based methods for toxicity assessment of a wastewater treatment plant effluent

Anlagen:

Anlage 1: Erfolgskontrollbericht TP6

1. den Beitrag des FE-Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Die Forschungsergebnisse führen mittelfristig zu einer Co-Nutzung des STC- Fischembryotests bei der Priorisierung von Monitoringproben. In Zusammenhang mit der Probenaufbereitung und den Extraktionsmethoden, die im Dept. WANA (R. Massei) im Rahmen des Teilprojektes weiterentwickelt wurden, wird die STC- Methode in der nächsten Zeit in mindestens zwei weiteren Monitoringprojekten genutzt. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls zu betonen, das die Ergebnisse der Mischungsanalysen, dazu führen werden, den Ansatz der Mischungstoxizität auch in die Überwachung und Bewertung von Gewässer und Abwässern weiter zu forcieren. Dies scheint nötig, da trotz großer Fortschritte in der Forschung der Gedanke der Mischungstoxizität in der Regulatorik immer noch nicht oder nur in geringen Ansätzen aufgenommen wurde.

2. das wissenschaftlich-technische Ergebnis des FE-Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen:

s. Abschlussbericht, Punkt II.3

3. die Fortschreibung des Verwertungsplans:

• Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Eine Erfindung oder Schutzrechtsanmeldung erfolgte nicht.

 die evtl. wirtschaftlichen Erfolgsaussichten nach Auftragsende (mit Zeithorizont) - z.B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien

Direkte bzw. kurzfristige wirtschaftliche Erfolgsaussichten (innerhalb der nächsten 2 Jahre) sind derzeit nicht zu erkennen. Allerdings wäre die Etablierung bzw. Anerkennung des Konzeptes der Bewegungsanalyse mittels der STC-Methode in der ökotoxikologischen Bewertung von Abwässern von Vorteil - sowohl für die Überwachungsbehörden von Kläranlagen bzw. die Kläranlagenbetreiber selbst.

• wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

wie im Abschlussbericht beschrieben (Punkt II.4) werden die Ergebnisse aus diesem Projekt u.a. in ein Folgeprojekt (JPI Nature) einfließen. Bei diesem Projekt liegt der Fokus auf Umweltproben, bei denen neben einer mittleren Pestizidbelastung eine Belastung mit Fungiziden, Bakteriziden, Antibiotika und anderen Pharmaka dazukommt. Der STC- Test mit Embryonen des Zebrabärblings soll auch hier bewerten, ob bestimmte Probestellen besonders stark von Pestiziden belastet sind, die neuroaktive Wirkungen entfalten können. Damit soll eine Priorisierung von Abwässern gelingen, um das Management der Reinigung von Abwässern zu vereinfachen. Die Arbeiten im JPI Projekt werden zusammen mit Forschergruppen aus Dänemark, Portugal, Spanien und Mali durchgeführt, da ein Ziel des Projektes ist, die verschiedenen Reinigungsverfahren von Abwässern in verschiedenen Klimazonen zu testen. Der Beitrag der ökotoxikologischen Bewertung u.a. mittels der STC- Methode soll eine schnellere und damit billigere Methode der Überwachung darstellen.

- die evtl. wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte
 - s. Abschlussbericht, Punkt II.3
- 4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben
 - ein Punkt, der im Arbeitspaket geplant war, war die Analyse der Biotransformation bzw. der Biotransformationskapazität der Fischembryonen.

In der wissenschaftlichen Literatur kommt es immer wieder zu wiedersprüchlichen Aussagen in Bezug auf die Nutzbarkeit des Fischembryotests für Analysen von bestimmten Substanzen - der Fischembryo soll weniger sensitiv gegenüber Substanzen sein, die z.B. mittels Biotransformation aktiviert werden (z.B. Pestizide der Organophosphatgruppe). Diese Aussage der Sensitivität konnten wir innerhalb der Projektlaufzeit nicht belegen oder widerlegen, da die Zeit nicht ausreichte. Zwar arbeiten wir derzeit noch an der STC- Analyse von Chlorpyrifos und dem aktivierten Chlorpyrifosoxon und möglichen Unterschieden in der Sensitivität der Fischembryonen, aber diese Arbeiten konnten bisher nicht beendet werden.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer : es sind keine Anwendertreffen geplant, da noch zu wenige Wissenschaftler*innen die STC-Methode nutzen.

6. die Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Die Bearbeitung des Forschungsvorhabens erfolgt mit kostenneutralen Verlängerungen der Laufzeit. Die Gesamtkosten der Vorkalkulation wurden eingehalten. Aufgrund der Corona Bestimmungen konnten die Analysen zur Biotransformation in den Fischembryonen. Teile davon sollen aber auch nach Ende der Projektlaufzeit veröffentlicht werden.

REVIEW

Open Access

() CrossMark

An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment

J. B. Legradi^{1,2*}, C. Di Paolo¹, M. H. S. Kraak³, H. G. van der Geest³, E. L. Schymanski⁴, A. J. Williams⁵, M. M. L. Dingemans⁶, R. Massei⁷, W. Brack⁷, X. Cousin^{8,9}, M.-L. Begout¹⁰, R. van der Oost¹¹, A. Carion¹², V. Suarez-Ulloa¹², F. Silvestre¹², B. I. Escher^{13,14}, M. Engwall¹⁵, G. Nilén¹⁵, S. H. Keiter¹⁵, D. Pollet¹⁶, P. Waldmann¹⁶, C. Kienle¹⁷, I. Werner¹⁷, A.-C. Haigis¹, D. Knapen¹⁸, L. Vergauwen¹⁸, M. Spehr¹⁹, W. Schulz²⁰, W. Busch²¹, D. Leuthold²¹, S. Scholz²¹, C. M. vom Berg²², N. Basu²³, C. A. Murphy²⁴, A. Lampert²⁵, J. Kuckelkorn²⁶, T. Grummt²⁶ and H. Hollert^{1*}

Abstract

The numbers of potential neurotoxicants in the environment are raising and pose a great risk for humans and the environment. Currently neurotoxicity assessment is mostly performed to predict and prevent harm to human populations. Despite all the efforts invested in the last years in developing novel in vitro or in silico test systems, in vivo tests with rodents are still the only accepted test for neurotoxicity risk assessment in Europe. Despite an increasing number of reports of species showing altered behaviour, neurotoxicity assessment for species in the environment is not required and therefore mostly not performed. Considering the increasing numbers of environmental contaminants with potential neurotoxic potential, eco-neurotoxicity should be also considered in risk assessment. In order to do so novel test systems are needed that can cope with species differences within ecosystems. In the field, online-biomonitoring systems using behavioural information could be used to detect neurotoxic effects and effect-directed analyses could be applied to identify the neurotoxicants causing the effect. Additionally, toxic pressure calculations in combination with mixture modelling could use environmental chemical monitoring data to predict adverse effects and prioritize pollutants for laboratory testing. Cheminformatics based on computational toxicological data from in vitro and in vivo studies could help to identify potential neurotoxicants. An array of in vitro assays covering different modes of action could be applied to screen compounds for neurotoxicity. The selection of in vitro assays could be guided by AOPs relevant for eco-neurotoxicity. In order to be able to perform risk assessment for eco-neurotoxicity, methods need to focus on the most sensitive species in an ecosystem. A test battery using species from different trophic levels might be the best approach. To implement eco-neurotoxicity assessment into European risk assessment, cheminformatics and in vitro screening tests could be used as first approach to identify eco-neurotoxic pollutants. In a second step, a small species test battery could be applied to assess the risks of ecosystems.

Keywords: Eco-neurotoxicity, Neurotoxicity, EDA, REACH, AOP, Behaviour, Computational toxicity, Ecological, Species

*Correspondence: jessica.legradi@bio5.rwth-aachen.de; henner. hollert@bio5.rwth-aachen.de

¹ Institute for Environmental Research, Department of Ecosystem Analysis,

ABBt-Aachen Biology and Biotechnology, RWTH Aachen University,

Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Background

Neurotoxic pollutants are an emerging issue beyond human health because neurotoxicants causes potentially serious threats to vertebrate and invertebrate populations and ecosystems in general. Indeed, neurotoxic chemicals are suspected to produce changes in organism behaviour (e.g. mating behaviour, predator escape response and feeding behaviour), which can reduce an individual's fitness, lead to population declines and ultimately have severe impacts on ecosystems [1]. Different classes of environmental contaminants, including metals and organic pollutants, were shown to affect the performance of complex behaviours in different fish species [2] and in wildlife [3, 4]. In wildlife, as in humans, early life stages are particularly sensitive to toxicant insults. Additionally, neurotoxic effects in early life stages might not be directly visible but lead to detrimental effects later in life. Besides, exposure to neurotoxic compounds can trigger epigenetic pathways which can underlie long-term effects as well as multior transgenerational effects [5, 6].

Typically, several thousand compounds are detectable in environmental samples, including synthetic and natural compounds and their transformation products [7]. However, knowledge regarding the neurotoxic potential of environmental contaminants in ecosystems is very limited, since the assessment of neurotoxicity is currently mostly focused on human exposure to individual chemicals. Known human neurotoxic or neuroactive compounds, such as pesticides, pharmaceuticals, and heavy metals, occur in the environment together with thousands of chemicals with unknown neurotoxic potential to different species and life stages. It has been estimated that up to 30% of all commercially used chemicals (~30,000 chemicals) may have neurotoxic potential [8]. Additionally, in a recent literature study looking at the known modes of action (MoA) of organic contaminants detected in freshwater monitoring studies, neurotoxicity was identified as the MoA linked to nearly 30% of all detected chemicals [9]. This shows the relevance of detecting neurotoxic compounds in the environment, increasing the demand for bioanalytical tools capable of identifying and possibly quantifying neurotoxic effects in organisms inhabiting contaminated ecosystems.

The aim of this article is to provide a critical overview of the state of the art of hazard characterization, effects, bioassays and chemical approaches regarding neurotoxicity in organisms as well as for ecosystems. This review will contribute a scientific perspective on the needs and future directions in neurotoxicity assessment for environmental protection (cf. Fig. 1).

Environmental neurotoxicity versus eco-neurotoxicity

Neurotoxicity can be defined as the capacity of agents (chemical, biological, or physical) to cause adverse functional or structural changes in the nervous system [10]. Environmental neurotoxicity describes neurotoxicity caused by exposure to chemicals in the environment and commonly refers to human exposure and human neurotoxicity [10]. In contrast, we define ecological neurotoxicity (eco-neurotoxicity) as neurotoxicity resulting from exposure to environmental chemicals in species other than humans (e.g. fish, birds, invertebrates). It is important to distinguish between human and non-human neurotoxicity as the effects of exposure to compounds, both in terms of levels and pathways, as well as the structure and function of the nervous system itself, can differ widely between species.

Current role of eco-neurotoxicology in risk assessment for regulation REACH/EU general food law

Within the current European chemical regulation, neurotoxicity is only assessed using in vivo test systems [11]. The EU legislation for industrial chemicals (REACH) assesses neurotoxicity only for compounds produced \geq 10 tons/year. These compounds need to be tested with standard oral 28-day and 90-day toxicity studies in rodents. Clinical observations including motor activity, a functional observational battery and histopathological assessments of the spinal cord and sciatic nerve can be indicators of neurotoxicity. If these tests indicate neurotoxicity at levels below systemic toxicity, more detailed neurotoxicity tests are required (OECD technical guideline (TG) 424 to assess neurotoxicity and TG 426 to assess developmental neurotoxicity).

In terms of ecotoxicological impacts, current guidelines for neurotoxicity assessment in vertebrates focus on mammals and birds [12–16]. There is no regulatory guideline available to identify neurotoxic risks to other vertebrates or invertebrate animals. Furthermore, thus far there is no European regulatory framework for econeurotoxicity assessment.

Within risk assessment and risk management of econeurotoxic substances, pesticides are a substance class of special interest. Some pesticides kill pests via neurotoxic mechanisms. Neurotoxic actions on non-target species have been determined for several species and pesticides [17–22]. The European Food Safety Agency (EFSA) is responsible for the registration of pesticides and all other substances that can contact or occur in food and are not assessed under REACH. Until now, the active compounds in pesticides need to be assessed for potential neurotoxic effects in mammals using the same rodent studies as under REACH (TG 424 and TG 426) only if it is indicative from their intended MoA or other information, like chemical structure, that the substance could be neurotoxic [23]. Neurotoxic effects on non-target species in the environment are not assessed.

Water Framework Directive

The European Water Framework Directive (WFD) aims to integrate biological and chemical information to obtain an overall insight into the quality of individual water bodies. According to the WFD, the chemical status of a water body is determined by analysing the concentrations of 45 priority substances, which are not selected based on their potential neurotoxicity. A good chemical status is defined by concentrations of all of these substances below the annual average and maximum allowable Environmental Quality Standards (AA- and MAC-EQSs), which are defined to protect the environment and human health [24].

As a result, regular chemical monitoring of the water quality is almost exclusively performed by targeted chemical analysis of a limited set of (indicator) compounds. There are, however, some serious limitations related to the use of target chemical analyses of large volume samples for monitoring the overall chemical status of a water body. First, because only a limited number of target substances are analysed, the risk of other, nonpriority and unknown substances in the aquatic environment remains unknown [25]. At present (August 2018), more than 142,000,000 substances are registered in SciFinder with the Chemical Abstracts Service, while there are over 140,000 substances that are produced over 1 ton/year listed in REACH. Some of those compounds might eventually end up in the environment. Second, it is obvious that chemicals do not occur alone in the environment, but as complex mixtures. While concentrations of individual chemicals can be below the lowest observed effect concentrations (LOEC) or detection limits, the entire mixture may still cause adverse effects [26]. Moreover, transformation products of micropollutants formed in the environment or by biological metabolism are not always known or registered and may be more toxic and persistent than the parent compounds [27]. These limitations may thus result in an incomplete assessment of chemical hazards and risks, e.g. [28], urging alternative approaches to be explored [29].

German drinking water ordinance

There is an urgent need for quick assessments of substances with unknown toxicological potential to prevent possible harm for consumers by water suppliers and public health departments, who supervise the process. At this time, there is no explicit regulation for neurotoxicity in drinking water in countries like Germany. While the German Drinking Water Ordinance (TrinkwV 2018) [30] gives threshold values for some metals, e.g. lead, cadmium, arsenic, with a known neurotoxic potential [31], no specific endpoints or proposals for a testing strategy are given for neurotoxicity.

The health-related indicator value (HRIV; in German: Gesundheitsbasierter Orientierungswert, GOW) concept provides a temporary value for toxicologically unknown single substances detected in drinking water systems. This hierarchically built concept is based on a precautionary in vitro approach with endpoints related to genotoxicity, neurotoxicity, endocrine disrupting effects and (sub-)chronic effects [32]. In a first step, several cell-based assays are used to detect effects of water concentrates or individual chemicals on basic parameters like apoptosis, necrosis and oxidative stress in HepG2 liver cells, Jurkat and U-937 blood cells. In a second step, organ-specific effects are compared between SH-SY5Y nerve cells and HepG2 liver cells using RTCA[™] and Caspase assay. Finally, neurotoxic effects like neural differentiation of SH SY5Y cells are measured. Therefore, this concept can be used for high-throughput screening with the first and second test level and for determining neurotoxicity-effect concentrations in the third assay step. Furthermore, this approach can be applied to compare chemicals or exposure situations, although other neurotoxic mechanisms may remain obscured. The current approach could be extended also for eco-neurotoxicity assessment.

Developmental eco-neurotoxicity

Developmental neurotoxicity (DNT) is particularly concerned with the effects of toxicants on the developing nervous system of organisms. The developing brain and nervous system is supposed to be more sensitive to toxic effects than the mature brain and nervous system [33]. Such studies must consider the temporal and regional occurrence of critical developmental processes of the nervous system, and the fact that early life exposure can lead to long-lasting or delayed neurotoxic effects [33].

Despite particular concern, the availability of information regarding developmental neurotoxicity of chemicals is very limited, even for humans. In a systematic literature review considering the neurotoxic potential of industrial chemicals to human populations, Grandjean and Landrigan identified 201 proven human neurotoxicants [34] and, moreover, they estimate that there are over 1000 compounds which were neurotoxic in laboratory animals, respectively [21]. Five of the 201 chemicals identified as human neurotoxicants were also classified as developmental neurotoxicants, while the other compounds could not be classified due to lack of experimental data [34]. Such low numbers demonstrate a clear lack of developmental neurotoxicity assessment studies. Additionally, a 2009 report indicated that only around 110 chemicals had been tested for potential human developmental neurotoxicity following respective OECD or US-EPA guidelines [35, 36]. As a consequence, there is a demand for time and cost-efficient testing methods capable of evaluating large numbers of chemicals for developmental neurotoxicity. Such methods may include in vitro and in silico tools as well as in vivo studies with alternative model species such as zebrafish (Danio rerio) [36]. Based on the 2009 reports [35, 36], an international collaboration was started led by Prof. E. Fritsche (IUF) with the goal to assemble a developmental neurotoxicity (DNT) testing battery for regulatory purposes. The in vitro testing battery will cover a variety of neurodevelopmental key events, distinct brain cell types and will investigate over 100 potential developmental neurotoxicants [37].

Developmental eco-neurotoxicity not only has to deal with similar challenges as for human neurotoxic investigations, such as complex temporal toxicity profiles due to different sensitivities of developmental stages combined with diverse target site susceptibility due to the complexity of the nervous system (depending on the species of interest), but in addition must consider the ecotoxicological perspective [38]. As a result, eco-neurotoxicity studies must aim to focus on protecting the most sensitive organisms and respective developmental stages among the multitude of different species in the environment.

In this sense, it is of great advantage that developmental eco-neurotoxicity can benefit from the knowledge obtained with model organisms such as the fish species medaka and zebrafish. Such fish models are used in both (developmental) neurotoxicity as well as in ecotoxicological studies, with investigations considering the involved MoAs and mechanisms of toxicity. For instance, changes in protein expression and whole mount antibody staining in medaka early life stages have been proposed as methodological approaches to characterize neurotoxic effects and respective mechanisms involved [39]. Zebrafish early life stages have been used as model organisms in a screening protocol to investigate environmental neurotoxicants considering various nervous system endpoints [40] and were proposed as systems toxicology models to support the identification of pathways of developmental neurotoxicity [41]. There are similar approaches with invertebrates, for example the characterization of sea urchins, which use neurotransmitters as embryonic growth regulatory signals, as model organisms for developmental neurotoxicity testing [42, 43]. Behavioural screening systems developed for zebrafish have also been applied for invertebrates like flat- and roundworms [44]. The nematode, *Caenorhabditis elegans*, is already a commonly used model organism for developmental biology and recently emerged as model organism for human neurotoxicity studies [45]. Their size makes them ideally suited for high-throughput behavioural screening approaches, whereas their well-known neurophysiology can be used to identify and study neurotoxic mechanisms. Although mostly used for human studies so far, flat- and roundworms could be easily used for environmental studies. There is also growing interest in using avian models, particularly the use of in ovo egg injection methods in which developmental exposures can be carefully controlled and linked with a range of structural and functional outcomes in the hatchling and later life stages [46, 47].

In the long run, developmental eco-neurotoxicity should integrate the outcomes of experimental investigations utilizing such ecotoxicologically relevant organisms with data from in vitro and in silico predictive models, in a similar way as proposed for humans [37]. In order to be successful, predictive developmental eco-neurotoxicity should consider the diverse mechanisms and MoAs involved, as well as their variation across species and toxicants, as already suggested for predictive ecotoxicology in support of ecological risk assessment [48, 49].

Epigenetics in eco-neurotoxicity

Epigenetics can be defined as the study of changes in gene expression that occur without changes in the DNA sequence, and which may be heritable. Inheritance is understood in two different ways; mitotic inheritance (i.e. from cell-to-cell through cell division) and meiotic inheritance (i.e. from one organism to its offspring through reproduction) [50]. Three main epigenetic mechanisms are generally described: DNA methylation, histone modifications and non-coding RNA [51, 52]. Cell-to-cell inheritance involves the maintenance of epigenetic marks during the life of the individual, offering very interesting hypotheses for delayed effects of exposure to toxicants in early stages of life. On the other hand, transgenerational inheritance of epigenetic marks could explain how specific traits that were induced by exposure to toxicants can be observed in offspring that itself is not directly exposed [53].

DNA methylation is the most studied epigenetic modification and consists in the methylation of cytosine nucleotides in the genome by DNA methyltransferase (DNMTs). One particularity of DNA methylation is that it can be depleted and replaced again during epigenetic reprogramming events to set up cell- and tissue-specific gene expression [52, 54]. More precisely, DNA methylation patterns are reprogrammed across the whole genome in early embryos and primordial germ cells. This is well known in the case of mammals [55, 56], but it has also been observed in flowering plants and other animals such as fish [57–59]. This process is essential for a normal development of the animal brain as it modulates the expression of neural genes during specific developmental time periods, but it may also represent a particularly vulnerable period for an exposure to toxicants [60, 61]. Consequently, an early life stage exposure to neurotoxicants may thus impact the later or adult phenotype by interfering with reprogramming, leading to negative consequences on the development of the central nervous system (CNS) [6, 62].

The exact MoAs of neurotoxic compounds on the epigenome are almost completely unknown. Neurotoxic effects of pollutants can be channelled by oxidative stress, mainly interfering with the ability of DNMTs to link and interact with DNA [5, 6]. Similarly, transient exposure to chemical compounds such as bisphenol A or valproic acid in the womb can alter DNA methylation and histone deacetylation processes, which has been linked to persistent consequences such as defective brain development and memory loss in later stages of life [63]. Parallel work in metals demonstrates that epigenetics may be a critical pathway for metal-induced neurotoxicity as a result of Fe, As or Cd exposure [6]. Impairment of human and animal behaviour following either pre- or post-natal exposure to neurotoxicants has been recorded and linked with neurodegenerative diseases in adults [64-67]. However, the role of epigenetics in the development of these degenerative processes requires further research.

Beyond the organism's lifetime, transgenerational epigenetic inheritance (TEI) may have critical implications for populations and species. The evaluation of a potential transmission of environmentally induced epigenetic modifications has been highlighted as a necessary field of research in ecological risk assessment [68]. Here, a clear distinction between intergenerational and transgenerational inheritance is required. The first involves a direct exposure of the germ cells that will later constitute the next generation, and the latter involves an indirect transmission of non-genetic information from one generation to another [69]. Evidence of TEI underpinning neurotoxic effects in multiple generations is very rare. A recent study by Knecht et al. reported transgenerational behavioural effects of benzo[a]pyrene on zebrafish exposed during development (hyper locomotor activity, hyper-avoidance behaviour) [70]. The same study also showed that global DNA methylation was decreased, as well as DNMT expression. Similarly, Carvan et al. showed a correlation between developmental induced transgenerational inheritance of abnormal behaviour in zebrafish exposed to methylmercury, and sperm epimutations in the second filial (F2) generation [71]. In another example, exposure of one generation of zebrafish to a complex mixture of PCBs and PBDEs simultaneously triggered changes in DNMTs expression and behaviour in larvae and/or adults in up to four non-exposed offspring generations [72].

The current understanding of epigenetics is strongly biased towards the use of laboratory animals such as mice and rats, which limits its applicability to eco-neurotoxicology. Nonetheless, the observed effects of neurotoxicity of some compounds in humans and laboratory animals can be transposed to wildlife: birds, terrestrial mammals or marine and freshwater organisms [73-77]. For example, in a comparative study DNMT activity and DNA methylation were measured in brain tissues from methylmercury-exposed mink (mammal), chicken (bird), and yellow perch (fish), thus showcasing how relevant epigenetic measures can be incorporated into laboratory-based studies on ecologically relevant species [78]. Altered DNA methylation has also been shown in Daphnia exposed to toxicants [79], highlighting that epigenetic effects are not only occurring in vertebrates. Behaviour mediates the interaction between the organism and its environment, e.g. helping organisms adapt to new environmental conditions [80]. Appropriate behaviour is crucial for organisms to survive. Neurotoxicants in air, water and/or soil could affect the CNS and the behaviour of organisms and lead to changes in ecology, particularly if the consequences of exposure to neurotoxicants can be transmitted to following generations. Epigenetics research may hold the key to understand the mechanisms of transmission of such environmental information, potentially playing a role in processes of rapid adaptation [81]. This aspect of eco-neurotoxicity requires further investigation by the scientific community to improve the understanding of the molecular underpinnings of eco-neurotoxicity and its long-term consequences on ecosystems.

Endocrine eco-neurotoxicity

Accurate spatial and temporal hormone signalling is required for correct neuronal development. Consequently, chemicals disrupting the hormone (endocrine) signalling during neurogenesis may cause severe, irreversible cognitive defects in exposed organisms [82]. For example, perturbation of the thyroid system was associated with motor and mental disorders in rats, apes and humans and the emergence of diseases such as attentiondeficit hyperactivity disorder/syndrome [83–86]. This is of concern for regulatory authorities since endocrine active compounds are ubiquitous in the environment [87, 88]. Hence, an increasing number of researchers are investigating the link between endocrine disruption and neurotoxicity [82, 85, 89–93]. Several studies, especially with fish, show an impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on behaviour, which is thought to be a representative endpoint for neurotoxicity [94– 99]. Evidence also exists for quails, tadpoles and a few invertebrate species, suggesting endocrine developmental neurotoxicity after exposure to EDCs. However, further research is needed to reveal possible links [91, 100–103].

While mechanisms causing developmental neurotoxicity remain unknown [92, 104], endocrine developmental neurotoxicity is of concern for the environment since hormone systems are conserved within animal taxa [105]. Adverse effects observed in the laboratory may thus occur in wildlife [82, 87]. To avoid effects on ecosystems and perform reliable environmental risk assessment, research needs to understand the mechanisms evoking neurotoxicity [93]. In addition, mixture effects, spatial and temporal exposure scenarios and community structures need to be considered [106–108].

Neurotransmitter system related modes of action of eco-neurotoxicity

One of the MoA relevant for eco-neurotoxicity are disturbances in electric signal transduction and inhibition of chemical signal transduction, mainly through interference with the neurotransmitters [109]. Examples include the inhibition of the degradation of acetylchol ine by blocking the enzyme acethylcholinesterase (AChE) in the excitatory synapses or by inhibition of the GABA (g-aminobutyric acid) preceptor in the inhibitory synapses [110].

Environmental pollutants such as DDT bind to open sodium channels in neurons, which prevents closing of the channels and leads to over-excitation [111]. Pyrethroids, such as permethrin, increase the time of opening of the sodium channels, leading to similar symptoms [112]. Lindane and cyclodiene insecticides block GABAmediated chloride channels [113]. Organophosphate insecticides bind to AChE and hence prevent the degradation of acetylcholine, leading also to overexcitation and severe toxic symptoms, when over 50% of the AChE receptors are blocked. Neonicotinoids (e.g. imidacloprid) bind to the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), and their binding is irreversible but the potency is much higher on insect nAChR than on the corresponding mammalian receptors [114]. However, they are dangerous to non-target insects like bees and have been associated with a decline in the bee population [115]. Phenyl-pyrazols such as fipronil bind to GABA receptors and the selectivity for insects over mammals is also caused by a higher binding affinity [116].

Most organophosphate insecticides are thio-phosphoesters that require oxidation prior to causing inhibition of AChE as is illustrated by diazinon in Fig. 2. The oxidation catalyzed by cytochrome p450 monooxygenases transforms diazinon to diazoxon, which binds to the esterase site on the AChE by releasing the pyrimidinol species as a leaving group (in this example 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol). The remaining AChE-phosphoester complex is then further hydrolysed, leading to a so-called ageing (irreversible binding) of the inhibitor-enzyme complex. AChE inhibitors that do not have a good secondary leaving group are reversible inhibitors as they do not age and can be



released again from the complex. In contrast the aged complex is fairly stable, and recovery is mainly due to new formation of AChE. In parallel to activation and inhibition, both diazinon and diazoxon can be detoxified by carboxylesterases and the resulting pyrimidinol can be conjugated prior to elimination.

As detoxification is the dominant pathway in mammals and oxidation is the dominant pathway in invertebrates, organophosphate insecticides are typically more toxic to invertebrates [117] than to vertebrates [118]. Differences in species sensitivity have been explained by the interplay between activation by oxidation and detoxification. The fish carp was found to be less sensitive than other fish species (trout, guppy, zebrafish) despite a more sensitive AChE site because it had the most active detoxifying enzymes [119]. Daphnia magna was found to be more sensitive to diazinon than Gammarus pulex, partially due to a six times slower detoxification by carboxylesterases, which compensated for the twice faster oxidative activation in G. pulex, but mainly due to toxicodynamic differences as observed by applying a toxicokinetic-toxicodynamic (TK-TD) model to survival data for G. pulex and D. magna [120]. TK-TD models are especially suitable to investigate the timedependent effects and complex mechanism of AChE inhibitors and allow estimation whether toxicokinetic or toxicodynamic parameters determine the overall effect [121]. Interestingly, for some organophosphate insecticides, the organism recovery is the rate-limiting step of toxicity [121]. For an uncoupler such as penta chlorophenol, the TK depuration and the TD organism recovery in *G. pulex* are 2 and 3 days, respectively; hence, the organism has basically recovered when it has eliminated the chemicals. However, this is different for carbaryl, chlorpyrifos and diazinon with a TK depuration of 1.4-11 days but a much longer organism recovery in the range of 15–28 days [121]. Hence, the sequence of exposure matters when mixtures are investigated over a time period [122].

Such detailed studies about the uptake, metabolism and excretion of neurotoxicants are extremely important as they help to link exposure to effects which is necessary to properly assess eco-neurotoxicity for different species.

In vitro eco-neurotoxicity approaches

As mentioned above, the research field of neurotoxicology is mainly focused on the potential effects of chemicals on development, structure and function of the human nervous system. There is general agreement within the field of toxicology that state-of-the-art toxicity testing includes tiered testing strategies that focus on the pathways that are critical for adequate functioning of cells, organs, and organisms, using different testing strategies to collect information on exposure and toxicity. This includes an emphasis on non-animal models, including integrated genomic and proteomic analyses of chemical-induced effects. This principle is embraced in the neurotoxicology research field and many efforts are focusing on developing and optimizing non-animal test systems to model such effects by increasing their sensitivity and specificity [123].

Non-animal test systems to test neurotoxicity include small intact organisms (zebrafish embryos, *C. elegans*), brain slices, cell lines, primary cell models and stem-cell derived models as well as assays assessing the inhibition of the bare enzyme (e.g. in the case of AChE inhibition assays) [124]. Different types of model systems have their own advantages and disadvantages related to multicellular complexity, ease of culture, variability between cultures, possibilities with regard to differentiation or genetic modification, species and costs. Test systems with non-mammalian test organisms [125, 126] may include ecotoxicologically relevant species, or methods to study the neurotoxicity endpoints may be modified to enable an application for other species.

Many neurotoxic mechanisms can be studied in vitro using biochemical and morphological endpoints that have the potential for medium-to-high-throughput testing. Parameters to investigate neuronal network functionality include network formation, action potential generation, calcium homeostasis, synaptic transmission, and synaptic plasticity. However, these assays were developed with the aim of studying effects of chemicals on the human (mammalian) nervous system and not on wildlife. Nevertheless, if the goal is to investigate whether neuroactive chemicals or chemicals with neurodevelopmental toxicity potential are present in the aquatic environment, these in vitro cell systems may also be suitable for water quality monitoring. Both ecotoxicological model species and in vitro bioassays for molecular mechanisms are included in the Smart Integrated Monitoring (SIMONI) framework for water quality monitoring [127].

Innovative experimental approaches are available to investigate effects on neuronal function, such as optical and electrophysiological measurements of intra- and intercellular signalling (calcium signalling, neurotransmitter release and post-synaptic receptor function) in cell models to measurements of spontaneous activity or network activity in neuronal networks using multi-electrode arrays (MEAs) [124]. Chemical-induced changes in network function measured in a MEA system may be due to changes in electrical activity as well as in the release or reception of intercellular signals. MEA systems thus provide an integrated, but not pathway specific, measure for effects on neurotransmission. Efforts are ongoing to increase throughput by using multi-well MEA systems. Primary (rodent) cell cultures can be used for routine neurotoxicity testing [128], and efforts are ongoing to increase throughput capacity of functional neuronal networks of (human) embryonic stem cells and neural/neuronal progenitor cells [129, 130]. The generation of large amounts of data, either by testing many samples using high-throughput approaches or by generating high density data (e.g. using MEAs or optical recordings), requires ample data storage. The resulting challenges associated with data analysis require the implementation of chem/ bioinformatics approaches.

If the aim of effect-based monitoring is to study the impact of neuroactive chemicals, or chemicals with neurodevelopmental toxicity potential, on ecologically relevant species, it is critical to consider (dis)similarities in brain development, structure and function between mammals and ecotoxicologically relevant species. Considerable underlying differences may exist between mammals and other taxa in sensitivity to neurotoxic chemicals [131]. For example, it is well known that, due to interspecies differences in kinetic parameters of AChE, insects are more sensitive to organophosphate insecticides than mammals [132]. Moreover, sensitivity to neurodevelopmental effects resulting from exposure to chemicals depends critically on the phase of mammalian brain development [33]. Specific sensitivity for neurotoxicity dependence on exposure timing may need to be investigated further using ecotoxicological model species. Additionally, neuronal network function depends critically on the presence of multiple cell types [133], including neurons, oligodendrocytes, microglia and astrocytes. The importance of multiple cell types for eco-neurotoxicology may depend on the endpoint of interest. It is thus required to identify the most relevant neuronal cell types and the impact of absence or presence of other cell types in the in vitro test system under consideration.

Due to the complexity of neurotoxic and neurodevelopmental mechanisms, and in view of potential differences between mammals and other species, it is recommended to develop a specific test set of chemicals for eco-neurotoxicity (including, for example, water relevant chemicals and model chemicals that affect relevant mechanisms) for (interlaboratory) studies to test candidate in vitro bioassays (e.g. based partly Aschner et al. [134]). Emerging techniques and innovations in neuroscience and neurotoxicity should be closely followed and assessed for their potential and applicability in ecotoxicological water quality monitoring.

Stem cells in eco-neurotoxicity

In the area of neurotoxicity and developmental neurotoxicity testing, the use of pluri- and multipotent stem cells differentiating into diverse neural cell types as well as standardized methods for differentiation will lead to an improved understanding of chemically induced adverse reactions. In contrast to cell lines or primary cells, stem cells and their derivatives are neither genetically transformed nor easily lose their tissue characteristics. However, differentiation conditions need to be strictly controlled to prevent differences in cell characteristics between cultures, which calls for appropriate control conditions to be included in toxicological testing procedures with stem cells. Neural differentiation occurs early in development and the formation of glial cells and neurons can quite easily be mimicked in vitro [135–138]. Thus, stem cells facilitate high-throughput neurotoxicity testing on a wide range of neural cell types. In this context, human induced pluripotent stem cells (iPSCs) have the potential to play an important role in predicting human-specific neurotoxicity and DNT [139]. Stem cell derived neuronal and glial models allow MoA-based DNT testing [37]. In recent years, the number of studies using stem cells for neurotoxicity and DNT testing with a variety of endpoints increased considerably. Many representative studies investigating neurotoxicity or DNT of drugs using stem cells applied endpoints such as cellspecific cytotoxicity (apoptosis, necrosis), cell migration, intracellular Ca²⁺ levels, disordered differentiation, neurite and dendrite outgrowth, neural network formation and activity, as well as synaptogenesis and synaptic activity [140-145]. Furthermore, 3D models such as neurospheres are now available and provide an improved comparability to the in vivo situation. Progress on in vitro 3D brain models has also been achieved [146]. 3D brain organoids derived from pluripotent stem cells are promising experimental models for brain development, DNT testing and neurodegenerative disorders enabling mechanistic pathway and stage-specific studies [147]. Despite this good progress in neurotoxicity and DNT testing with stem cells, validated methods for several endpoints still have to be established.

Mechanisms employed in the in vitro stem cell neurotoxicity and DNT testing are in general highly conserved in evolution. Results based on highly conserved mechanisms can be transferred to a variety of species, including aquatic organisms.

By now, many protocols for generating specific neuronal populations of different areas of the brain and peripheral nervous system using human iPSCs are available, and their efficiency is continuously increasing [148]. To date a general problem is that the protocols generate a heterogenous population comprised of the specific neurons they aimed for and also other cells, which may have a different identity. This increases the variability of potential test readouts. Also, especially for peripheral neurons,

very long maturation times are needed to generate mature neurons, and tests performed at an earlier time point may be disturbed by the immature cellular answer of some of the cells. Additionally, some protocols suffer from a low reproducibility and relatively high variability. Thus, many repetitions are need, which renders the potential tests time and cost intensive. Current research is focusing on improving these shortcomings, and one solution is already in use: differentiating iPSCs into neuronal precursor cells offers the possibility to freeze and store larger amounts of cells of one differentiation, which then can be defrosted for the tests. This has the advantage that several tests can be run with the cells that were generated at the same time, at least until the precursor state. In most protocols for neuronal differentiation, many cells are lost during the first few days, thus making it hard to predict the cell number resulting from a single differentiation, even though a constant number of iPS cells were used. Now, one can defrost neuronal precursor cells and use a specific number of these cells for the last steps of the differentiation protocols, during which cell loss is almost negligible. This approach allows for a better control over the total number of generated neurons, thus increasing the comparability between different sets of tests.

Using gene-editing and other genetic methods progenitor cells can, e.g. be transduced to stably express Ngn2 under a Tet-On Advanced transactivator, allowing differentiation to be switched on by adding tetracyclin [149].

Apart from mice and rats, which often serve as model systems for human diseases, iPSCs from other mammals, such as farm animals [150], pets such as dogs [151] or endangered wild animals such as felids or orangutans [152, 153] are reported and offer a whole new set of opportunities to study the impact of environmental toxicity on their physiology.

A drawback of iPSCs is that the cells lose their epigenetic signature during reprogramming. To overcome this problem, somatic cells were used to transdifferentiate into neurons, bypassing the iPSC-state. Although to date the yield of this method is low and protocols show high variability, this allows to study age-dependent effects and may be a worthy option for eco-neurotoxicity testing in the future (see, e.g. collection of papers here: [154]).

Cell-free neurochemical methods

Cell-free neurochemical assays are simplified in vitro systems that may help evaluate the effects of a test chemical on neurobiochemical processes. Cell-free assays are performed with cell lysates, tissue homogenates or with purified membranes (but not with living cells) and give information about direct biochemical interactions between test molecule and biological targets like receptors. They form an important assay category within the US-EPA's ToxCast program and show promise for use in ecotoxicology as discussed by Arini et al. [155]. A great advantage, for example, is that they are amenable for use from any species from which brain tissue can be obtained, with one study comparing responses across 20 species of fish, mammals and birds [156]. Besides studying chemicals, cell-free assays have also been used to screen extracts from real-world samples including pulp and paper mill effluents [157] and wastewater effluents [158].

Sensory system tests in eco-neurotoxicity

Neurotoxic effects on sensory systems are mostly studies in vertebrates. Little is known about effects in invertebrates. Sensory structures receive information from the environment and transduce it into a signal recognizable to the nervous system. The information or stimuli can be of different modality including light, sound, smell, taste, pressure and temperature. Generally, receptive cells contain transmembrane receptors which undergo a conformational change upon stimulation. A signal transduction cascade leads to the opening of ion channels and concomitant membrane potential changes, thereby creating an action potential. Many behaviours like feeding, mating, predator avoidance, migration, social interaction and communication are crucially informed by sensory systems. Thus, their impairment can have severe impact on fitness and survival of an animal.

Environmental contaminants such as pharmaceuticals, pesticides and heavy metals have been shown to interfere with the sensory structures of different species including humans and fish, thereby creating deficiencies in sensation and behaviour. Behavioural output is an increasingly measured, ecologically relevant and very sensitive endpoint. To localize specific sensory impairments within the nervous system using behaviour is, however, challenging because behaviour is the integrated output of multisensory, neuroendocrine and neuromuscular signals, and tests are often not specific enough (e.g. impaired feeding might result from motor deficits, impaired olfaction, impaired vision or a combination thereof).

Generally, four techniques listed in Table 1 are applied to assess the different sensory systems like, e.g. olfaction, vision and mechanosensation (discussed below). While all of them have their advantages and drawbacks, there is no recommendation as to which one is the best. Rather, tests have to be tailored to the study purpose and a multidisciplinary integrated approach is necessary to fully understand neurotoxicity mechanisms [2].

	Sensitivity	Throughput	Specificity	Remarks
Electrophysiology	+++	+	+++	Link to behaviour often unclear, sophisticated preparations needed
Behaviour	++	+++	+	Multisensory input; depends on proper locomotor function; high ecological relevance
Anatomical changes	+	++	+++	Only apparent when sensory function already impaired
Molecular markers	+/+++*	+++	+/+++*	Good sensory toxicity markers are still rare

Table 1 Techniques to test sensory system

* Depending on marker

Olfaction

In fish, the olfactory system is particularly vulnerable to neurotoxic contaminants because of the direct contact of olfactory sensory neurons with the surrounding water. Reduced or absent ability to smell (hyposmia or anosmia) have been shown to occur upon exposure to metals, pesticides and other contaminants like, e.g. surfactants [159]. The classical method to assess olfactory impairment is by electro-olfactography [160]. It assesses electrophysiological changes in olfactory sensory neurons by extracellular recordings. Olfactory behavioural tests include either attraction to food extract, avoidance of skin extract or attraction/avoidance of the chemical itself [159]. Notably, while the zebrafish olfactory system offers several experimental advantages to study sensory neurobiology in general and olfactory neurotoxicity in particular, there are a number of profound differences that might render translation of results from such studies to other species.

Among the major advantages of the zebrafish model are (i) identified ecologically relevant classes of natural odours such as amino acids and bile acids [161, 162]; (ii) cultivation of the adult zebrafish head ex vivo without anaesthesia, allowing neurophysiological measurements in the intact brain [163]; (iii) comparably small brain size that provides access to larger fractions of neurons by multiphoton microscopy [164]—a fact particularly true for the zebrafish olfactory system, which contains relatively few neurons and glomeruli [165]; and (iv) large detailed data at both the single neuron and population level that allows realistic mathematical simulations of circuit function [166]. Moreover, at first glance, the zebrafish olfactory system contains molecular and cellular constituents that appear similar in organization to the rodent olfactory system, thus, providing an attractive vertebrate model system to investigate the mechanisms underlying olfactory system development and function. However, the fish olfactory epithelium is of a "mixed" type, containing two major types of olfactory sensory neurons, i.e. ciliated and microvillous neurons. Both express distinct types of chemosensory receptors, project to different brain regions and likely mediate different behaviours [167]. Moreover, the three canonical zebrafish chemosensory gene families (*or, taar* and *olfC/V2r*) are somewhat unique and quite distinct in size and relative proportions to those of most tetrapods (indicative of the divergence of both lineages ~ 430 million years ago [168].

The mouse has become the most widely used model system in olfactory research based on established protocols for genetic manipulation. An important distinction between the olfactory systems in fish and mice is stimulus delivery. While the fish olfactory organs are exposed to pollutants and xenobiotics that are dissolved in water, rodent noses constantly sample volatile air-borne chemicals at minute concentrations. Thus, the range of potentially hazardous chemicals that water-living species like fish are naturally exposed to will be dramatically different from the repertoire of potential harmful compounds that land-living species like mice encounter (and vice versa). The olfactory system's remarkable capacity to renew upon perturbation also needs to be taken into account [169]. The olfactory epithelium has extensive neurogenic and regenerative capacity in both rodents and humans that persists throughout adult life and is unmatched elsewhere in the nervous system [170]. Cells within the basal epithelial layer function as neuronal precursors, multipotent progenitors and/or stem cells. However, the niche signals that control the self-renewal and differentiation of these basal cells are not well understood [170]. This regenerative capacity will strongly impact eco-neurotoxicological assays that target the olfactory system. Accordingly, the system's vulnerability will, at least to some extent, be compensated by adult neurogenesis.

Few neurotoxicological assays have been developed using mice. This is somewhat surprising given the large body of knowledge available, established animal care facilities, comparably short generation turnover and the large translational promise that rodent model systems offer. Thus, it appears likely that future eco-neurotoxicology assays will utilize a pipeline that spans cell-based in vitro experiments, high-throughput behavioural assays in zebrafish and other ecologically relevant species.

Vision

About 3000 chemicals are toxic to the human eye and visual system [171]. Retinotoxic effects for organic

solvents and metals have been described, not only for humans [172] but also for fish [173–176], for which most literature focuses on effects of methylmercury and ethanol. Moreover, the fish retina was affected upon herbicide [177, 178] and pesticide exposure [179] and was shown to accumulate cocaine [180]. Electrophysiological measurements of retinal function are called electroretinograms. They record the retinal sum field potential to a visual stimulus [181] and are applied in many species including fish [182]. Visual behaviour tests for fish are well developed, even to the point that different visual properties like motion detection, colour detection and discrimination, object recognition and visual acuity can be tested [183]. A popular assay is the measurement of optokinetic reflex, in which the animal is presented a moving grating which it follows with accurate eye movements. Impaired visual function results in reduced or absent eye movements [184, 185]. Although both techniques are widely established in zebrafish models for human ocular diseases [186], toxicant-induced impairments of visual function are only scarcely studied. Instead, retinotoxic effects are mostly assessed based on rather insensitive endpoints like histology or eye size (e.g. microphthalmia=smaller eyes).

Mechanosensation

Hair cells are sensory cells of the vertebrate inner ear and the lateral line system of aquatic vertebrates. They transduce pressure changes in the surrounding medium into a neuronal signal as a result of deflection of their cilia, which leads to the opening of ion channels, enabling the detection of acoustic stimuli and hydrodynamic flow. Many drugs such as aminoglycoside antibiotics, platinum-based anti-cancer drugs, anti-malarics or nonsteroidal anti-inflammatory drugs are known to induce ototoxicity in humans (see references in [187]), for the most part irreversible. In fish, some of these drugs equally cause ototoxicity and damage to the lateral line [188]. Moreover, metals such as copper, cadmium and others have been shown to cause hair cell death and deficits in behavioural responses in zebrafish [189, 190] and other fish [188]. Behavioural responses to acoustic stimuli [191-193], responsiveness to water motion [194] and rheotaxis (counter-flow swimming) [195, 196] have been measured to assess hair cell function. Moreover, vital dyes to stain hair cells have been widely used to assess the structure of lateral line hair cells in zebrafish [197]. Effects on the lateral line hair cells are one of the most promising sensory endpoints because of their great accessibility, amenability for staining's and dyes and straightforward implication in rheotactic behaviour [198]. Another method to assess hearing abilities in fish is sound-evoked potential audiometry, which measures field potentials in response to an auditory stimulus using cutaneous electrodes [199].

In order to assess the full neurotoxic potential of environmental pollutants, a combination of tests and the assessment of multiple sensory systems are necessary to precisely localize effects within the nervous system [2, 200]. Future studies should strive to increase our mechanistic understanding of chemical neurotoxicity, which would help predicting eco-neurotoxicological effects. In this respect, model organisms such as the zebrafish are very helpful, because a large variety of genetic tools and genomic resources are available and many tests are already established for the analysis of human brain disorders [98], but they are not yet fully adopted for neurotoxicity testing. Additionally, emerging neuroscience techniques such as in vivo 2-photon calcium-imaging of neuronal activity [201-203] or optogenetics [204] might hold underexplored opportunities for the mechanistic dissection of complex neurotoxicological processes. Moreover, large-scale toxicity screenings using the zebrafish model has been implemented in the framework of ToxCast and Tox21 [205-208], but more efforts are needed to increase the specificity of tests for sensory neurotoxicity in larval zebrafish and implement them in a high-throughput manner in order to keep pace with toxicity testing of the vast number of newly registered chemicals.

Biomarkers of eco-neurotoxicity

Biomarkers are defined as molecular, biochemical, cellular and physiological changes, caused by external stress factors. The two mostly discussed groups of biomarkers are: biomarkers of exposure that allow statements about the quality and/or quantity of exposure, whereas biomarkers of effect allow statements about effects and the health status of exposed organisms [209]. Classical examples for the first category are metallothioneins, which indicate metal contamination [210]. A typical biomarker of effect is the induction of stress proteins (heat shock proteins) [211] or a decrease of lysosomal stability [212]. With the latter two one can tell that the organism was exposed to environmental stressors, but it is not possible to tell, which stressor or contaminant exactly caused the observed effect [209]. Biomarkers can either be measured invasive/destructively, e.g. by determining enzyme inhibition in brain or whole-body homogenates or nondestructively, by determining the biomarkers of interest, e.g. in blood, mucus or skin samples [213, 214].

Biomarkers of eco-neurotoxicity include parameters reacting specifically to neurotoxic chemicals. The most well-known biomarker of effect for neurotoxicity is the measurement of AChE inhibition. This is the primary mechanism of action of organophosphate and carbamate insecticides. Enzyme activity is quantified in brain or whole-body homogenates of exposed organisms, and compared to reference inhibitors, as has been shown, e.g. for zebrafish embryos [215], fish [216] and Daphnia magna [217]. In addition, non-destructive measurement of cholinesterase is possible, e.g. by determining butyrylcholinesterase in blood serum [218, 219]. Alternatively, commercially available isolated AChE can be used to test chemicals and complex environmental mixtures such as water samples. The tests applied are typically based on the Ellman assay [220], which is a colorimetric assay that detects the hydrolysis of the substrate acetylthiocholine. Despite its wide application in water quality assessment, the assay using isolated AChE should be used with caution because concentrations of organic matter as low as $2 \text{ mg}_{C}/\text{L}$, when present in solid-phase extracts of typical surface water, can act as non-specific inhibitor of AChE [221]. This can lead to an overestimation of insecticidal activity in ambient samples. The application of cholinesterase biomarkers for environmental monitoring has been reviewed by Mineau [222].

Other biomarkers of eco-neurotoxicity involve key neurotransmitter pathways and the measurement of corresponding enzyme inhibition or receptor activity, i.e. neurochemical biomarkers. Apart from AChE and the corresponding nicotinic and muscarinic receptors, activity of monoamine oxidase with dopamine or serotonin receptors, GABA transaminase with GABA(A) and GABA(B) receptors as well as glutamic acid decarboxylase and glutamine synthetase with the receptors NMDA, AMPA and Kainate can be determined. These biomarkers have been applied in studies on a variety of organisms such as worms, bivalves, fish, mammalian wildlife and birds (for review see [38]). For example, documented measurements have included a decrease in serotonin levels and an increase in monoamine oxidase levels in caged mussels in a river downstream of wastewater treatment plants effluent [223]. If mussels were exposed to primary treated and ozonated effluents in a flow-through experiment, GABA levels as well as the activities of several neuroactive enzymes (glutamic acid decarboxylase, monoamine oxidase and AChE) were reduced and levels of serotonin and dopamine increased [224]. With regard to fish, the application of biomarkers of eco-neurotoxicity has been reviewed in several publications [2, 225, 226]. In juvenile rainbow trout, altered brain neurotransmitter metabolism after exposure to β -naphthoflavone and benzo(a)pyrene resulted in impaired availability of serotonin at short term (after 3 h) and increased neuronal metabolic utilization of serotonin and dopamine after 24 and 72 h [227].

For any study, it has to be taken into account that the flexibility (plasticity) of the nervous system, as well as

the age and developmental stage of the investigated organisms, may play an important role in the measured responses [38].

Behavioural screening tests

For aquatic eco-neurotoxicological screenings, behavioural toxicity tests in small organisms may be of special interest. Behaviour is an understudied but sensitive and ecological relevant endpoint in ecotoxicity testing for all kinds of different species. Several studies reported effects on behaviour at concentrations orders of magnitudes below lethal concentrations [228, 229]. Behaviour is the integrated response of the conditions to which an organism is exposed. A variety of activities are used as behavioural endpoints to screen for effects of chemicals, for example avoidance, feeding and locomotion [1]. Some of these behavioural endpoints may be applicable to investigate rapid acute neurotoxic responses or effects of longer exposures with consequences that may have larger impact, such as neurodevelopmental effects. Such effects on behaviour may be caused by acute neurotoxic effects on neuronal functioning (inter- and intracellular signalling and neuronal network function to receive, conduct, and transmit signals via chemical or electrical synapses and relay information between specific brain regions for information processing as well as learning and memory formation) or to mechanisms related to neurodevelopmental processes (proliferation, migration, differentiation, formation of axons, and dendrites, synaptogenesis, network formation and apoptosis). Automated behavioural analysis technologies allow medium-to-highthroughput assessments.

Part of behavioural disruptions resulting from chemical exposure may rely on direct neurotoxicity or parental transfer, but beyond this direct relationship, behaviour is an interesting endpoint because it may also be an integrative indicator of several other physiological issues, e.g. metabolism, sensory organs, morphology or molecular pathways alteration.

Behavioural test with laboratory fish species

The fact that behavioural responses may be integrative indicators of many physiological issues explains the rapid expansion of behavioural studies in ecotoxicological research during the last decades, particularly those using fish early life stages (ELS). Indeed, fish ELS are very amenable to high-throughput monitoring evaluation in multi-well plates. With that system behaviour like basal activity, response to a light change or other stimuli (indicative of anxiety) can be assessed. For the photomotor response test with zebrafish embryos, it has been even shown that different compound groups induce different behavioural profiles which mean the test can be

used to identify neurotoxic MoAs of compounds [230]. In addition, the possibility of using behaviour as a complementary approach to common fish embryo toxicity (FET) tests has recently been explored, demonstrating a significantly higher sensitivity of behaviour EC50 compared to FET LC50 for some compounds [231]. ELS have, however, a limited behavioural repertoire which is partially linked to a lower level of nervous system maturation compared to older stages. For example, it appears that learning associated with classical and operant conditioning is not efficient in zebrafish before 3 weeks of age, which is roughly the end of the larval stage [232]. In addition, and partly related to this limitation, the predictability of late outcomes from behavioural disruption in ELS is not obvious. As an example diquat, one of the compounds tested by Kluver et al. showed no behavioural disruption in ELS while it induced hyperactivity in older larvae [233].

Juveniles or adults have a much larger behavioural repertoire and/or cognitive abilities, which can easily be divided in behavioural units and evaluated. Behavioural disruptions resulting from exposure to organic pollutants, including PAHs or PCBs have been characterised using long-term dietary exposures to environmental mixtures. An increase in psychological stress is a common trait observed relating to all examined pollutants [234]. In case of PAHs, a decrease in the neurotransmitter serotonin could be the driver for this behavioural change [235]. More recently, behavioural changes in the offspring of fish exposed to a mixture of PCBs and PBDEs showed that even if exposed parents displayed no change in behaviour, two offspring generations showed a significant increase in anxiety as adults while behaviour of larvae was modified in up to four offspring generations.

Behavioural tests with non-fish species

Van der Geest et al. showed that changes in ventilation behaviour of fifth instar larvae of the caddisfly Hydropsyche angustipennis occurred at approximately 150 times lower copper concentrations than mortality of first instar larvae [229]. Avoidance behaviour of the amphipod Corophium volutator to contaminated sediments was 1000 times more sensitive than survival [236]. Chevalier et al. tested the effect of twelve compounds covering different toxic MoA on the swimming behaviour of daphnids and observed that most compounds induced an early and significant swimming speed increase at concentrations near or below the 10% effective concentration (48 h) of the acute immobilization test. A reduction in defence and orientation behaviour of rusty crayfish after exposure to nicotinoid pesticides below morphological effect concentrations was observed by Sohn et al. [237]. The clam avoidance behaviour (closing valve after trigger) is suggested as a fast and easy screening tool for neurotoxicants [238]. Diamesa zernyi larvae from the wild also showed altered swimming behaviour after exposure to contaminants at low effect concentrations [239]. These examples and numerous others all showed that organisms may exhibit altered behaviour at relatively low and therefore often environmentally relevant toxicant concentrations [240]. Behavioural responses to toxicant exposure can also be very fast, allowing organisms to avoid further exposure and subsequent bioaccumulation and toxicity. A wide array of such avoidance responses have been incorporated in ecotoxicity testing [28, 241], including the avoidance of contaminated soil by earthworms (Eisenia fetida) [242], feeding inhibition of mussels (Corbicula fluminea) [238], aversive swimming response to silver nanoparticles by the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii [243] and by daphnids to twelve compounds covering different toxic MoA [240].

Field studies

Field studies are the most relevant approach to evaluate disruption resulting from chemical exposure but have drawbacks since it is (currently) almost impossible to disentangle the consequences of chemical exposure from other stressors such as food deprivation or environmental changes other than chemicals. On the other hand, laboratory experiments generally using optimal conditions except for the chemical exposure may lead to an underestimation of these exposure effects. They allow, however, the establishment of a potential direct link between exposure and physiological effects, including behavioural disruption. Indeed, behavioural abilities condition individual survival and fitness and hence have consequences at the population level. In the environment, behaviour abilities are important, e.g. to find food, to escape predators, to find new territory or partners for mating. All these behaviours are complex and rely on simpler so-called behavioural units, which are of ultimate importance in behavioural ecology because they are what can be measured [244].

Subtle changes in animal behaviour may affect trophic interactions and ecosystem functioning. Langer-Jaesrich et al. reported that midge larvae (*Chironomus riparius*) exposed to chlorpyrifos, a neurotoxic insecticide, showed a decrease in burrowing behaviour, resulting in an increase in the feeding rate of zebrafish preying on these exposed chironomids [245]. However, when exposing predators and prey simultaneously, no significant differences in the feeding rate of zebrafish were observed, suggesting impairment in prey recognition of the exposed zebrafish. In a laboratory toxicity experiment Hunting et al. (2013) observed that endpoints representing ecosystem structure and functioning, like bacterial diversity, bacterial activity and decomposition, responded much more sensitively to copper exposure than survival of the isopod *Asellus aquaticus* [246]. Monitoring the behaviour of the isopods by measuring the redox potential of the first upper cm of the sediment revealed that, although the isopods did not suffer from mortality upon the copper exposure, they became completely inactive. The lack of locomotion and shredding activity of the isopods caused the ecosystem processes to cease.

Since behavioural responses can be very fast, they can also be employed in early warning systems, with manifold applications. These so-called online-biomonitoring systems are installed to monitor the water guality permanently, and if the animals show an abnormal behaviour, an alarm goes off. This allows, for instance, the cessation of water intake for drinking water preparation. One of the most widely applied online-biomonitoring system is the Multispecies Freshwater Biomonitor^{1M}, based on a non-optical recording principle, the quadrupole impedance technique for several aquatic and sediment in/vertebrate species. This device quantitatively records behavioural patterns in a fully automated way on a real-time basis [247, 248]. Another approach uses fluorescence emissions and can be used to measure chlorophyll and thereby monitor phytoplankton biomass [249]. Daphnia and fish behaviour can also be monitored using cameras [250]. The valve opening of clams can be monitored using attached electrodes [251]. Behaviour is a fast and sensitive endpoint to toxicant exposure, allowing e.g. avoidance behaviour to be incorporated in online-biomonitoring systems. Subtle changes in animal behaviour may affect trophic interactions and ecosystem functioning, underlining the importance of incorporating behavioural endpoints into ecotoxicity testing.

Mixture toxicity

The last decades have seen steadily rising volumes and numbers of industrial chemicals. Many of these substances are released into the environment, and thus, contamination comprises a mixture of different chemicals, each posing different characteristics and potential toxic responses towards humans and wildlife. Moreover, the large number of untested industrial chemicals and transformation products hampers comprehensive risk assessment of complex real-world mixtures of toxic chemicals. Regularly, contaminated environmental samples contain high numbers of many different pollutants which makes it an analytical challenge, including workup, separation, detection and quantification. Therefore, it is also difficult to assess the myriad of putative mixture effects and unknown toxic effects of old, new, and emerging chemicals in biological systems [252]. Additionally, the concentrations of pollutants in environmental samples are diverse and most of the time site-specific. This will cause also different biological response depending not only on the presence of certain pollutants but also on their relative composition [253]. One practical implication of this in connection to contaminated sites is that risk assessments still mainly rely on chemical analysis. However, such analysis does not always provide any information regarding the interactions between chemicals, including their integrated toxicological effects on organisms. Particularly, under regular environmental conditions organisms are exposed to multiple chemicals associated with different risks and the underlying toxic responses may generate toxic effects at levels exceeding the combined effects of single compounds. Thus, it has been recommended that combination effects of the entire mixture of contaminants should be evaluated in risk assessments [254, 255]. Therefore, many different toxic effects need to be checked. The neurotoxic potential of environmental chemicals presents a serious threat since they can, for instance, alter the behaviour of organisms. However, guidelines for neurotoxicity assessment consider only mammals and birds, and, thus far, there is no regulatory framework for neurotoxicity assessment in aquatic systems. DNT, which evaluates effects on the developing nervous system of foetuses, larvae, and juveniles, has special relevance for environmental risk assessment due to the ecological importance of early stages for recruitment and maintenance of natural populations. Despite this, DNT testing is currently required for human health risk assessment only and involves labourintensive, time consuming and expensive animal testing. Consequently, few chemicals have been tested for DNT, leaving the potential impacts of untested chemicals and their combined effects unknown [256, 257]. Particularly, many pesticides are well known to act as neurotoxic compounds and commonly occur as complex mixtures in aquatic systems but concentrations are often low. Populations and communities of different species, however, can be dramatically impacted by low concentrations of pesticides, e.g. [258, 259]. Moreover, it is well known that pesticide mixtures contain compounds with similar and dissimilar MoAs [260] that can cause either concentration additive, synergistic neurotoxicity as well as unpredicted mortality depending on the combinations of different pesticides [260-262]. As a consequence, for chemicals with the same MoA, it might be possible to estimate their combined neurotoxicity using common models. However, known neuroactive compounds detected in the environment, such as pesticides, pharmaceuticals and heavy metals, occur together with thousands of chemicals of unknown neurotoxic potential, with different MoAs, and often in low concentrations.

Therefore, there is a great demand for the development of meaningful effect-based methods to be applied for the screening and investigation of the neurotoxicity of chemicals and their combined effect.

One approach to identify/prioritize toxic compounds in mixtures is using toxic pressure modelling. Toxic pressure is the probability that measured field concentrations will be above laboratory effect concentrations causing adverse effects to an ecosystem [263]. The toxic pressure gives an indication what species might be affected by environmental contaminations. To calculate the toxic pressure, chemical analyses of compounds are used together with corresponding laboratory data. The toxic pressure of a mixture is determined by quantifying the potentially affected fraction (PAF) using species sensitivity distribution modelling for each compound in the mixture. In the following, mixture modelling is applied to estimate the mixture toxic pressure [264]. This method can be used either to calculate water quality standards, to prevent adverse effects or to predict potential effects of the current exposure situation by calculating the multiple-substances potentially affected fraction (msPAF). The program to calculate the msPAF or rank substances based on their toxic contribution is freely available [265]. To apply this method for eco-neurotoxicity risk assessment, laboratory data for neurotoxic effects for a variety of species are needed.

Challenges in chemical analysis of neurotoxic compounds in environmental samples

For describing the behaviour, fate and effects of neurotoxic substances in the environment, analytical methods providing sufficient selectivity and sensitivity are required to achieve limits of quantification in the ng/L and μ g/kg range for water samples and biota, respectively.

The diversity in the chemical properties of neurotoxic substances requires a variety of analytical methods for their identification and quantification. Chromatographic separation techniques combined with mass spectrometric detection are largely used for determining organic trace substances. For the determination of neurotoxic substances in solids, advanced extraction techniques are usually required to separate the analytes from many organic matrix compounds prior to analysis.

For the determination of organic substances, liquid chromatography coupled to a mass analyser (LC–MS) is the most frequently used analytical method. Electrospray ionization (ESI) is a robust ionization technique for polar neurotoxic substances. The MS/MS technique is used to reduce the chemical background thus leading to better signal-to-noise ratios. In triple quadrupole mass spectrometers, the analyte ions are selected in the first quadrupole filter and fragmented in the second quadrupole (collision cell), whereas one or more produced fragment ions are selected and detected in the third quadrupole filter. This so-called multiple reaction monitoring (MRM) enables the determination of neurotoxic substances in water in the lower ng/L range without any preconcentration techniques. For the analysis of biota, however, the much higher sample complexity (matrix) requires an increase in the selectivity of the mass spectrometer. One possibility to reach this is to replace the third quadrupole filter by a high-resolution mass analyser (HRMS). The time-of-flight (TOF) or Orbitrap technology is used in such hybrid instruments. A further benefit of using HRMS is the detection of all ions which are generated in the ion source. Thus, the datasets can be screened for substances which were initially not anticipated (so-called non-target screening).

In gas chromatography with mass spectrometric detection (GC–MS), the separation of analyte and matrix compounds (via the gas phase) usually takes place in capillary columns. Electron ionization (EI)—i.e. the interaction of energetic electrons with gas phase molecules—leads to ionization and fragmentation of analyte molecules. The fragment ions are subsequently detected.

For the analysis of metals, the preferred analytical methods are atomic absorption spectroscopy (AAS) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For determination of metals in solids, chemical digestion (e.g. HNO_3/H_2O_2) is required. If the binding form or oxidation state of the metal should be retained during sample preparation, a suitable type of chemical digestion has to be selected. In this case, the ICP-MS is coupled with a separation method (e.g. ion chromatography).

EDA in eco-neurotoxicity

Tens of thousands of unknown chemicals and toxicants can be detected in environmental samples, but in many cases only a few chemicals are responsible for significant risks to the ecosystem [7]. The concentration of chemicals may be variable in time and space and may include known but also unexpected and unknown environmental pollutants [7]. Since a comprehensive analysis of the whole chemical universe is technically impossible, it is necessary to develop tools to reduce the complexity of environmental contamination and identify the key contributors to a specific effect [7].

Effect-directed analysis (EDA) was confirmed to be a powerful tool for the identification of chemicals causing effects to aquatic organisms or posing long-term risks such as endocrine disruption [266–268]. The EDA approach is based on the combination of chemical and biological tools isolating single substances or mixtures causing effects in laboratory bioassays. A typical EDA workflow (Fig. 3) follows certain steps starting with biotesting of specific effects in an environmental sample. If the bio-testing reveals toxicity, the complexity of the sample can be reduced by fractionation, and fractions without biological activity are eliminated. Several fractionation steps can be performed until the toxic fractions are sufficiently isolated to allow identification by target and non-target chemical analysis [7].

Despite the fact that neurotoxicity was confirmed to be one of the most important MoAs observed in environmental samples [9], the number of EDA studies focused on the detection of neurotoxicity and neuroactive compounds is still very limited. One important example is give in the study of by Qu et al. who identified in vitro neurotoxicity induced by brominated flame retardants in environmental samples [269]. They used a combination of cell-based assays, fractionation and liquid/gas chromatography coupled with mass spectroscopy (LC and GC–MS) for the identification of neurotoxic brominated flame retardants in different environmental matrices [269].

In vitro AChE inhibition tests are most frequently used as effect-based tools in EDA for the identification of neurotoxic chemicals in water samples [233, 245, 270, 271]. The AChE assay was used for the identification of 50 neurotoxic compounds in spiked surface water samples by using an innovative 2-dimensional thin-layer chromatography [272]. Ouyang et al. developed a high-throughput EDA method for the fast identification of AChE inhibitors in wastewater treatment plant effluents by using LC– MS and a novel micro-fractionation workflow followed by an in vitro bioassay screening. This study successfully identified the presence of three potential AChE inhibitors

identified the presence of three potential AChE inhibitors (tiapride, amisulpride and lamotrigine) in environmental samples. It is important to underline that the in vitro AChE assay may still fail in the detection of causative neuroactive compounds during EDA studies and falsepositive results are often observed in in vitro testing, since many molecules may form unspecific bindings with the purified enzymes [271].

In this context, in vivo and organism-level methods were also successfully applied in a few studies for the identification of neurotoxicity in environmental samples. In particular, behavioural and molecular tools using zebrafish embryos were used with good outcomes in different EDA studies for the identification of anticonvulsant drugs and natural toxins in plant extracts [273–275].

Finally, scientists are currently also working on the implementation of high-throughput techniques that are potentially useful in EDA for the identification of neurotoxic chemicals [276, 277]. As a major example, Fabel et al. successfully developed a fast novel workflow for the



online biochemical detection after chromatography of potential AChE inhibitors [276].

Cheminformatics approaches to assess eco-neurotoxicity

While many argue that assessing neurotoxicity requires animal models, due to the sheer number and potential mixtures of chemicals as well as animal testing requirements, a shift to in vitro assays and computational toxicity approaches is required [278]. Fortunately, large quantities of chemical biological data have been released into the public domain over the past 10 years. This includes data that have resulted from the US federal governmentsponsored high-throughput screening programs such as Tox21 and ToxCast [279] testing thousands of chemicals against hundreds of assays (some of which are related to neurotoxicity). Furthermore, the development of online repositories such as ChEMBL [280] and PubChem [281] has resulted in collection and integration of chemogenomics data extracted from literature and/or directly deposited by researchers. Toxicological programs such as ToxCast (>4000 chemicals and>1000 high-throughput assays [282]) screening individual chemicals are extraordinarily resource intensive. Furthermore, as discussed above, a variety of neurotoxicity assays are needed to capture relevant endpoints [283]. Relevant neurotoxicity assays of varying sophistication and suitability for highthroughput studies include microelectrode arrays [128, 284], yeast assays [285, 286], assays using zebrafish [200, 287] and neural organoids derived from three-dimensional stem cell cultures [130].

In light of the chemical complexity in our environment, as discussed above, it is essential to connect predictive toxicity methods with the chemical signatures in samples to identify potential novel neurotoxicants in the environment before extensive neurotoxicity testing is performed. Computational toxicity approaches combined with literature-mining approaches and expert knowledge offer exciting ways to do this. Extensive work has already been performed by many research groups worldwide, screening drugs and potential neurotoxicants using various bioassays and collected into online resources such as ChEMBL and PubChem, including for instance the PubChem Classification Browser allowing sophisticated queries (e.g. results for Parkinson's disease [288, 289]. In particular, the U.S. EPA National Center for Computational Toxicology provides their data for download [290], including their in vitro data, and is incrementally releasing their data and computational models through the CompTox Dashboard [291]. This provides access to chemistry data, integrates to in vitro assay and exposure data, and links to external resources and literature-mining functionality [292]. The Dashboard has both prediction and generalized read-across models (GenRA) [293]. This resource therefore provides direct access to a suite of data and tools that can support neurotoxicity research as a hub for data and information for chemicals, including e.g. lists of known (human) neurotoxins [294]. Initiatives such as the Abstract Sifter provide users with an interactive Excel sheet to explore the occurrence of chemicals and endpoints in the literature [295]. One approach to connect these computational efforts to environmental observations includes incorporating neurotoxicity endpoints into "virtual fractionation" investigations (i.e. correlating environmental signals with toxicological effects in a statistical approach before performing extensive EDA), which is possible on both known and unknown signals [7]. Incorporating toxicological information during identification efforts in chemical analysis can help to prioritize signals of interest (as performed for mutagenicity, e.g. [296] and is now possible in the in silico identification approach MetFrag [297]. Extensions to MetFrag [298] to better integrate the computational toxicity information offered by the CompTox Dashboard, PubChem and other resources are underway. This will offer exciting new ways to prioritize candidates to improve non-target screening efforts [29] in all ecotoxicity contexts, including neurotoxicity. Connecting these efforts to big data approaches such as those implemented in GNPS [299] will offer novel data-mining opportunities in the years to come [300].

The AOP concept in eco-neurotoxicity

The adverse outcome pathway (AOP) framework is intended to structure evidence of mechanistic toxicity information for a more effective use in risk assessment and regulatory decision making [301]. An AOP is triggered by a molecular initiating event (MIE), which is the interaction of a compound with a molecular target such as a receptor, and further outlines the sequence of key events (KE) along different levels of biological organization from the molecular level up to the adverse outcome at a level of regulatory concern. The latter is generally the organismal level in human toxicology and the individual or population level in ecotoxicology. One of the earliest conceptual AOPs proposed concerned the neurotoxicity of domoic acid [302]. The OECD has taken on the task of coordinating international collaboration and harmonization of AOP development. The AOP-Wiki [303] aims at centralizing AOP descriptions into a publicly available repository to facilitate their application by the (eco)toxicologist community from industry, academia and regulatory institutions.

Two AOPs for neurotoxicity have been endorsed by the OECD, i.e. "Chronic binding of antagonists to *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) during brain

development inducing impairment of learning and memory abilities" [304] and "Binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain causing excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment" [305, 307]. Four more neurotoxicity AOPs are currently either under review or approved (AOPs 10, 12, 42, 54). These describe binding to ionotropic GABA receptors leading to epileptic seizures [306], the role of NMDAR antagonists in neurodegeneration during ageing [307], and neurodevelopmental toxicity through interference with thyroid hormone synthesis (2 AOPs, [308]). For all of these AOPs, the focus is mostly on human health, although in some cases fruit fly, zebrafish or bobwhite quail data are included as weight of evidence. About 25 other AOPs currently being developed in the AOP-Wiki with a primary human toxicological perspective mainly focus on thyroid hormone disruption, and adrenergic, dopaminergic, serotonergic and opioid pathways.

AOPs covering neurotoxicity in an ecotoxicological context (about 25 in total in the AOP-Wiki) are at this point in time less advanced in general. Development of eco-neurotoxicity AOPs currently focuses on interference with cholinergic pathways leading to colony loss in bees and acute mortality in multiple species [309, 310], serotonergic (5-hydroxytryptamine transporter, 5-HTT) pathways leading to population changes in bivalves [311], and histamine, glutamate and GABA pathways, while some well-characterized pathways in mammals are currently lacking. Figure 4 shows an AOP network illustrating the current focus areas of eco-neurotoxicity AOP developers in the AOP-Wiki, as well as the interrelated-ness of these research topics.

Currently, AOPs are mostly being developed separately for human toxicology and ecotoxicology, while many mechanisms are shared, especially among vertebrate taxa. The philosophy of modular AOP development facilitated by the AOP-Wiki, the evaluation of taxonomic applicability of AOPs and the concept of AOP networks [312], has the potential to aid in bridging the gap between these two fields. Figure 5 shows that although development of many human and eco-neurotoxicity AOPs are currently rather distinct processes, some connections between both fields are being established. The AOP of AChE leading to acute mortality provides a good example, since a specific effort has been made to make a broad assessment of taxonomic applicability based on species sensitivity distributions and sequence similarity assessment of the molecular target [310]. Other examples of studies that have attempted to broaden the taxonomic applicability domain of neurotoxicity AOPs include Gong et al. [306] for ionotropic GABA receptor antagonism and Fay et al. [311] who used Sequence Alignment to Predict Across Species Susceptibility (SeqAPASS, [313]) to assess conservation of the molecular target, in this case 5-HTT, across species.

Molecular targets of environmental contaminants with neurotoxic/neuroactive mode of action

AOPs for eco-neurotoxicity would support the development of bioassays for the detection of (converging) KEs that can be used to evaluate complex mixtures of chemicals triggering diverse neurotoxic AOPs. The recent AOP-Wiki (including putative AOPs) already reflects various targets and associated molecular initiating events that are known to lead to interference with the function and development of the nervous system (see previous section). Furthermore, many environmental contaminants



are known to interact with a biological target relevant for the function of the nervous system. This interaction can mostly be inferred from the intended biological effect in case of pharmaceuticals, pesticides and biocides. However, it remains to be demonstrated whether the intended biological target, such as the serotonin receptor, is also the MIE leading to a relevant adverse outcome and if other mechanisms of action than the reported pharmacological or insecticidal mechanism are leading to a neurotoxic/neuroactive effect as well. Compounds that have not been designed for biological activity (such as industrial chemicals) could also unintendedly impact on a target relevant for neuroactivity. Furthermore, available information on neuroactivity/neurotoxicity often stems from a specific animal class (e.g. mammals in case of pharmaceuticals) and it is not known whether the neuroactive mechanism also applies to other organisms.

An estimation of whether the recent AOP-Wiki captures some of the reported biological targets and associated AOPs of environmental contaminants (based on available information on neuroactivity) can be made by analysis of the mechanisms of action of contaminants frequently detected in the environment by large-scale analytical chemistry. By combining the data from studies that measured the concentration of several hundred different chemicals in three European river catchments (Danube, Rhine, Mulde/Saale), compounds with neurotoxicity/neuroactivity to any species were found as the largest group of chemicals with known MoA or target accounting for 13% of the 426 chemicals that were detected in at least one of the catchments [9].

By assigning a major molecular target to each of the neurotoxic/neuroactive chemicals in the study of Busch et al. using databases (DrugBank, IRAC) and



Fig. 4 AOP network showing all AOPs relevant to eco-neurotoxicity that are available in the AOP-Wiki (https://aopwiki.org; Accession date: April 30, 2018; AOP numbers 16, 77, 78, 79, 80, 82, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 113, 160, 161, 178, 195, 197, 203, 204; Network constructed using Cytoscape 3.6.1). Nodes in the network are key events (KEs), and edges represent key event relationships (KERs). Molecular initiating events are displayed in green, adverse outcomes in red. All other KEs are depicted in blue. Solid edges are adjacent KERs, dashed arrows are KERs that have been defined as non-adjacent (see the OECD's users' handbook for developing and assessing AOPs for more information, [333]). Node size represents node degree (the total number of KERs connecting the KE to the network, Villeneuve et al., and edge thickness represents the number of times a given KER is part of constituent AOPs in the network. While some of the AOPs in the network have been published, many are in early stages of development, and none have been reviewed or endorsed by the OECD. This figure and its annotations therefore merely illustrate the current focus areas of eco-neurotoxicity AOP developers in the AOP-Wiki, as well as the interrelatedness of these research topics. The AOP network does not make any inference about the scientific validity of the underlying AOPs, nor can it at this stage be used for in-depth biological interpretation or regulatory application. ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; 5-HTT, 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter; GABA, gamma-aminobutyric acid; Glu, glutamate; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride



public literature, 16 different mechanisms were identified (Table 2). Based on the hazard quotient (HQ), i.e. the ratio of observed concentrations and the measured or predicted effect concentrations for fish and daphnids, the different mechanisms of neuroactivity can be ranked with respect to their environmental relevance. Fifteen of those refer to a functional interference and only one represented a compound with developmental neurotoxicity (simazine, a herbicide with evidence to inhibit proliferation and differentiation of dopaminergic nerve cells [314]). This assignment could be partially biased since for some chemicals (i) the mechanism is not precisely known, (ii) other (neuroactive) mechanisms are reported as well and/or (iii) the data often stem from drug development or drug toxicity studies, and information whether the mechanism is applicable to environmental organisms is lacking. Nevertheless, the HQ assessment represents a useful approach to prioritize neurotoxicity AOPs that would be of major interest in ecotoxicology.

The HQ analysis using data from the study of Busch et al. [9] indicated that AChE inhibition is one of the

most dominant MIEs, represented by 16 of the detected neurotoxic chemicals and displaying the highest HQs. These compounds are mainly pesticides but also include a few drugs such as rivastigmine used in the treatment of Alzheimer disease [315]. An elaborated AOP is available for fish toxicity [310] and assays that relate to the MIE (AChE enzyme activity, e.g. [316]) or key events (e.g. behaviour analysis in fish embryos relating to the KE of hyperactivity and paralysis, [231]) are available. AChE inhibitors are also well known for their relatively weak species specificity and they affect mammals and invertebrates as well. The highest HQs were found for invertebrates, which probably reflect the high sensitivity of invertebrates (AChE inhibitors have been mainly developed as insecticides). The ranking of AOPs for neuroactivity/neurotoxicity in ecotoxicity could be used to prioritize further development of AOPs by applying the following principles: (i) establishing AOPs for MIEs targeted by compounds with high HQ, (ii) filling of data gaps to address species specificity, (iii) establishing new AOPs with focus on organisms and KE-related assays that

(Danube, Rhine, Mulde/Saale)		1	1		
MIE	Compound name	HQ histogram fish	HQ histogram daphnia	Captured in AOP-wiki?	Reported species specificity
AI	n/a	Counts Counts Counts Counts	to a convict state of the conv	n/a	n/a
Acetylcholinesterase inhibition	Triphenylphosphate, rivastigmine, tris(1, 3-dichloroisopropyl)phosphate (TDCPP), carbofuran, carbetamide, methomyl, methiocarb, pirimicarb, ethyl-azinphos, chlorpyrifos, diazinon, chlorfenvinphos, chlorpyrifos-methyl, dimethoate, carbaryl, TMPP (tris (methyl phenyl) phosphate)	courts courts	rog tq conuts	Yes	Conserved among vertebrates and invertebrates [298]
GABA receptor antagonism	Fipronil	0 4 8 0 4 5 0 9 10 10 10 10	Counts 0 4 4 2 0	Similar (non-competitive GABA receptor block- ing)	Compound-specific differences in target sensitivity [306]
Serotonin reuptake inhibition, lead- ing to stimulation of serotonergic neurons	N,O-didesmethyl venlafaxine, cit- alopram, O-desmethylvenlafaxine, venlafaxine	Counts	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Yes	Human pharmaceuticals but potential neuroendocrine effects in invertebrates [307]
Antagonism of serotonin, dopamine and/or alpha-adrenoreceptors	Metoclopramide, trimipramine	0 4 8 0 4 2 0 5 1 5 0 0 0 4 2 0 0 0 5 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	Counts 0 4 4 2 0 6 4 4 2 0 Log H0	Not available	
Opioid receptor agonism	Tramadol, morphine, codeine, metha- done	0 4 2 0 0 100 H 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	Counts	Yes	
Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonism	Thiacloprid, acetamiprid, imidacloprid, levamisol, thiamethoxam, clothiani- din, cotinine	0 4 2 0 6 14 2 0 0 16 14 2 0 0 0 16 14 2 0 0 0 16 14 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	Counts 6 4 2 0 6 4 4 2 Log H	Yes	Specific for Insects in contrast to parent compound nicotine [308])
Enhancement of GABA action via allos- teric binding to GABA receptor	Primidone, flunitrazepam, diazepam, midazolam, oxazepam, pentobarbital, lorazepam	Counts	Counts 0 4 6 4 - - - - - - - - - - - - -	Not available	

Table 2 Compounds with neuroactive mode of action that were found during large-scale chemical analysis of samples from three European river basins



MIE	Compound name	HQ histogram fish	HQ histogram daphnia	Captured in AOP-wiki?	Reported species specificity
NMDA-type glutamate receptor antagonism	Dextromethorphan, ketamine, 1-ada- mantylamine	Counts Counts Counts Counts	Counts	(only for agonism)	
Inhibition of adenosine receptor (CNS stimulation)	Clopidogrel (and derivatives), caffeine	Counts	Counts	Not available	
Dopamine reuptake inhibition, lead- ing to stimulation of dopaminergic neurons	Bupropion, cocaine	Counts	Counts 6 4 2 0 6 4 2 2 0 Log H0	Not available	
Dopamine receptor antagonism	Sulpiride, amisulpride	Counts Counts Counts Counts Counts Counts	Counts 6 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	Not available	
Voltage gated sodium channel antago- nism	Lidocaine, carbamazepine (including derivatives), lamotrigine		Counts	Yes	
Release of serotonin, dopamine and noradrenaline	MDMA/methylendioxymethampheta- mine, MDEA/3,4-methylenediox- yethamphetamine	Counts 6 6 6 6 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	courts	Not available	
Proliferation and differentiation of dopaminergic nerve cells	Simazine ^a	Counts Conts Log HO	Counts 0 	Not available	
Inhibition of monoamine oxidase (leading to reduced metabolism and hence, increased levels of serotonin and noradrenaline)	Moclobernide	Counts Counts Counts Counts Counts Counts	Counts 0 4 4 4 2 0 0 10 4 4 4 2 0 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 1	Not available	

F
a
Š
2
Ξ
E
8
3
2
Ð
9
Ta

MIE	Compound name	HQ histogram fish	HQ histogram daphnia	Captured in AOP-wiki?	Reported species specificity	
Voltage gated calcium channel inhibi- tion (reduces release of transmitters such as glutamate or noradrenaline)	regabalin, gabapentin, gabapentin- lactam	Courts Courts Courts	Counts	Not available		

I

Compounds were grouped according to a common target and molecular initiating event (MIE). Data were extracted from Busch et al. and supplemented with more details on the major reported mechanism of action. Note that the mechanism of action can be highly species-specific but that species specificity is often not known. Hazard quotients (HQ = measured environmental concentration/effect concentration) represent predicted values (baseline toxicity multiplied by a factor of 10 or 100 for non-narcotic compounds) if no measured effect concentrations were available (please refer to Busch et al. for further details). Higher log HQs (close to zero) indicate that environmental concentrations are biological effect. Note that all AOPs of the AOP-Wiki (http://www.aopwiki.org) are under development

^a Simazine is a herbicide, but strong evidence for a neurotoxic mode of action in non-target organisms was reported [304]

provide the opportunity to develop screening assays, and (iv) identification of converging KEs that could be used to develop bioassays that would allow to detect compounds targeting different AOPs. Identification of converging KEs would be useful in case of screening of compounds or the assessment of the cumulative impact of complex environmental mixtures using bioassays, given that otherwise large testing batteries to address different mechanisms would be required.

Development of neurobehavior AOPs to predict population level impacts across species

Behaviour assays can be powerful endpoints for contaminant experiments because behaviour integrates the internal physiological state of an animal with the animal's response to external stimuli at the same time [317] and can be a good indicator and measure of sublethal effects. Changes in behaviour can be incorporated into the AOP framework as whole organism responses, and it is useful to do so because of the potential utility of using AOPs for cross-species extrapolations and ecological risk assessment, and for using the fish embryo as a substitute for many traditional toxicity tests. Neurobehavioural impacts of contaminants have been documented in previous laboratory [318, 319] and/or field [320] studies involving fish.

Embedding behaviour into an AOP that predicts ecologically relevant adverse outcome is challenging because it is difficult to interpret subtle changes in behaviour in terms of population demographics. There have been some development in methods to link behavioural outcomes to population relevant impacts that are suitable for ecological risk assessment [321-324]. As fish larvae are particularly sensitive to predation and starvation, impaired behaviour related to foraging and predator avoidance may have drastic consequences to the individual [325]. Ecologically relevant behaviours that should be measured in contaminant-exposed fish include swimming speed, startle response, reactive distances, prey capture ability, learning and memory. These behaviours can be related to the probability of escaping a predator, capturing prey for feeding and encounter rates using statistical models. Some examples of directed laboratory studies that were used to focus on behaviour relevant to ecological processes such as foraging and predator avoidance and subsequently used to construct an individual based model calibrated for particular species and populations are available [323, 324].

With behaviour as a pivot key event in the development of an AOP, there are challenges associated with incorporating suborganismal information. Prior to the onset of clinically apparent neurobehavioural damage, significant changes in brain neurochemistry occur and monitoring such changes using neurochemical biomarkers or key events represents an objective and early means to identify key molecular initiating events. The associations between measurable disruptions in brain gene expression measured using RNAseq, metabolomics and reverse engineering, and probabilities of capturing prey and avoiding predators can then be incorporated into a larval fish cohort model (e.g. [321, 322, 324, 326]), to predict survival and growth of the cohort. Cohort survival and growth can also be easily translated into parameters relevant to common metrics used by regulatory agencies (e.g. EC50; [322]), and can also be incorporated into a matrix population model to predict population effects of contaminant via induced changes in behaviour [327]. However, more work is needed to use valuable behavioural assays to create powerful AOPs that link the effects of chemicals from the level of molecular initiation all the way to the population.

The AOP framework has been proposed to be suitable for cross-species extrapolations [328]; however, for neurobehavioural studies, there are distinct challenges that will have to be addressed. Right now, in ecological risk assessment just a few selected species that are easy to maintain in the laboratory are used to make decisions on over 32,500 species of fish [328]. Test species are rarely selected for geographical range, physiology or life history. However, as baseline behaviour can vary widely between species, and as it is challenging to get non-laboratory model organisms to behave normally in laboratory settings, applying the neurobehavioural response as a key event to indicate population outcomes can be difficult for many species [326]. To perform cross-species extrapolations, the AOP framework can be used to identify key events that are more informative and easier to measure. For example, it may be possible to develop a neurobehavioural AOP in a model species like the zebrafish and extrapolate to other species of ecological importance. A neurobehavior AOP that targets larval life stages (a stage that is easy to maintain and test in the laboratory) would be ideal for cross-species extrapolations and would be in direct concordance with the spirit of the NRC 2007 report "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy" [329]. To use the zebrafish or another model species to predict neurobehavior adverse outcomes in another species, the same information should be collected at every level of biological organization across multiple KEs to determine what information is useful for cross-species comparisons, what information is lost by using a model species and the errors associated with cross-species assumptions [326, 330]. Essentially, there may be KEs that can be measured at the suborganism level that are better at predicting population outcomes than neurobehavioural KEs. Once a few crossspecies comparisons have been completed using the AOP framework in a systematic way, the neurobehavioural KE may be replaced with a molecular or cellular KE and used to make population predictions for alternate species instead. These molecular/cellular KEs are likely to be more amenable to high-throughput methods than behavioural responses.

Conclusions

Current situation

Considering the increasing numbers of environmental contaminants, their unknown neurotoxic potential, the physiological and morphological complexity of the nervous system, and the wide range of potential consequences of neurotoxicity, it is a major challenge to identify and advance neurotoxicity testing strategies and methods that improve neurotoxicity and eco-neurotoxicity assessment [331]. Additionally, neurotoxicity end especially eco-neurotoxicity is a challenging endpoint. Developmental processes, hormones, epigenetic regulations, the microbiome and many other processes can all impact nervous system functioning. Toxic MoA can be rather simplistic like AChE inhibition, but even then, differences in species sensitivities can make it rather difficult to assess eco-neurotoxicity.

Recommendations

Effects

Many different compounds such as flame retardants, plasticizers, pesticides and pharmaceuticals are suspected to be neurotoxic based on epidemiological studies in humans and eco-neurotoxic based on environmental species. Neurotoxic effects can be seen after exposure to trace levels of micropollutants. There is only very limited information available when it comes to eco-neurotoxic effects but based on what is known we propose that:

- Neurotoxicity studies should include the sensitive stages of development for the selected test species. Additional testing for developmental effects, including long-term effects, with, e.g. zebrafish, medaka, bird eggs, should be performed.
- Epigenetic effects should be investigated. Epigenetic effects can indicate multi-generation effects, which are especially relevant when looking at whole ecosystems.
- The biomolecular process like transcriptomic or metabolomic changes and their link to behavioural alterations should be investigated in more detail.
- Due to the close link between the hormonal system and the nervous system, endocrine effects should be tested for potential neurotoxic effects.

- Most known neurotoxic MoA describes interference with synapse functioning like binding to neurotransmitter receptors or effects on calcium homeostasis. Species-specific differences in sensitivity are often due to differences in the detoxification metabolism. This should be taken under consideration when selecting species or assays. To compensate for this, pre-metabolization steps could be included or metabolites tested as well as parent compounds.
- The application of TK–TD models might be helpful to better understand the impact of different exposure scenarios.
- Mixture assessments for solely neurotoxic substances but also in combination with non-neurotoxic substances are needed.

Chemistry

The number of compounds in daily use and consequently emitted in the environment is increasing and monitoring all of them in the environment is challenging, especially in biota. Potential solutions are to

- Identify potential unknown neurotoxicants within an environment using effect-based monitoring that can be combined with effect-directed analysis. Reliable, high-throughput assays are needed to enable this approach.
- Use cheminformatics approaches or toxic pressure modelling to incorporate computational toxicological information with chemical (monitoring) data.

Assays

Current in vivo test systems are mostly developed for human neurotoxicity assessment, although they could be easily adapted for ecological use. The current systems mostly do not allow large-scale screening. To be able to screen all relevant environmental contaminants for their neurotoxic potential, novel screening approaches are needed.

These assays should be:

- Applicable for high-throughput, cost-efficient and alternatives to animal testing.
- Due to the complexity of the nervous system, only a test battery of in vitro assays covering different MoAs will be able to replace current whole animal tests. To develop such a battery, it is necessary to understand the involved mechanisms of toxicity and to establish causal relationships between neurotoxicity endpoints and behavioural consequences [332]. AOPs might help in selecting targets.

• Developing a set of test chemicals, covering different MoAs might be useful for assay validation studies.

Risk assessment

In Europe, neurotoxicity of compounds is only assessed for human exposure thus far, and only for medium and high production volume chemicals, not based on exposure levels. Effects on organisms in the environment are not considered.

- Online-biomonitoring systems for measuring behaviour of sensitive organisms within an ecosystem could be used as early warning systems.
- EDA and Toxic Pressure modelling could be used to identify hazardous substances.
- To include eco-neurotoxicity assessment, cheminformatics in combination with in vitro screening tests could be used as *first tier* to screen compounds found in an ecosystem for neurotoxicity. AOPs can be helpful in guiding this process. In vitro assays for relevant mechanisms of neurotoxicity could then be implemented, validated and combined in a test battery. For eco-neurotoxicity assessment, species differences should be considered in the selection of in vitro assays.
- In a *second tier, a* test battery using small species covering different trophic levels could be used to assess risks of ecosystems. Such testing batteries could be also applied for mixture assessment and in combination with effect-directed analysis to identify neurotoxic pollutants in the environment.

There is a clear need to better understand how compounds can cause eco-neurotoxicity and how this differs between species. Only when the most sensitive species is protected, harm to the environment can be prevented. Novel methods or strategies need to be developed, able to deal with the large amounts of environmental pollutants, the complexity of the nervous system and the diversity of the ecosystem. Such methods will allow to implement eco-neurotoxicity as part of EU legislation.

Abbreviations

AA-EQS: annual average environmental quality standards; AAS: atomic absorption spectroscopy; AChE: acetylcholinesterase; AOP: adverse outcome pathway; CNS: central nervous system; DNMT: DNA methyltransferase; DNT: developmental neurotoxicity; ECHA: European Chemicals Agency; EDA: effect-directed analysis; EDC: endocrine disrupting chemical; EFSA: European Food Safety Agency; ELS: early life stage; ESI: electrospray ionization; FET: fish embryotoxicity test; GABA: g-aminobutyric acid; GC–MS: gas chromatography coupled to mass spectrometry; GenRA: generalized read-across models; HQ: hazard quotient; HRIV: health-related indicator value; HRMS: high-resolution mass analyser; ICP-MS: inductively couples plasma mass spectrometry; KE: key event; LC–MS: liquid chromatography coupled to mass spectrometry;

MAC-EQS: maximum allowable environmental quality standards; MEA: multielectrode array; MIE: molecular initiating event; MoA: mode of action; MRM: multiple reaction monitoring; msPAF: multiple-substances potentially affected fraction; NMDAR: *N*-methyl-*D*-aspartate receptors; PAF: potentially affected fraction; REACH: registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals; SIMONI: smart Integrated monitoring; TEI: transgenerational epigenetic inheritance; TK-TD: toxicokinetic-toxicodynamic; TOF: time-of-flight; WFD: Water Framework Directive.

Authors' contributions

JL, CDP and HH conceptualized the manuscript. JL and CDP edited the manuscript and coordinated the contributions. MHSK, HGvanderG, ELS, AJW, MMLD, RM, WB, XC, M-LB, RvanderO, AC, VS-U, FS, BIE, ME, GN, SHK, DP, PW, CK, IW, A-CH, DK, LV, MS, WS, WB, DL, SS, CvomB, NB, CM, JK, TG and HH contributed specific aspects to the manuscript and improved the manuscript content. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

Institute for Environmental Research, Department of Ecosystem Analysis, ABBt-Aachen Biology and Biotechnology, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany.² Environment and Health, VU University, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands. ³ FAME-Freshwater and Marine Ecology, Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam, P.O. Box 94248, 1090 GE Amsterdam, The Netherlands.⁴ Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, 6 Avenue du Swing, 4367 Belvaux, Luxembourg. ⁵ National Center for Computational Toxicology, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 109 T.W. Alexander Dr., Research Triangle Park, NC 27711, USA.⁶ KWR Watercycle Research Institute, Groningenhaven 7, 3433 PE Nieuwegein, The Netherlands. ⁷ Department Effect-Directed Analysis, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstr. 15, Leipzig, Germany.⁸ Ifremer, UMR MARBEC, Laboratoire Adaptation et Adaptabilités des Animaux et des Systèmes, Route de Maguelone, 34250 Palavas-les-Flots, France.⁹ INRA, UMR GABI, INRA, AgroParisTech, Domaine de Vilvert, Batiment 231, 78350 Jouy-en-Josas, France.¹⁰ Ifremer, Laboratoire Ressources Halieutiques, Place Gaby Coll, 17137 L'Houmeau, France.¹¹ Department of Technology, Research and Engineering, Waternet Institute for the Urban Water Cycle, Amsterdam, The Netherlands.¹² Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology, Institute of Life, Earth and Environment, University of Namur, 5000 Namur, Belgium.¹³ Department of Cell Toxicology, Helmholtz Centre for Environ mental Research-UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany.¹⁴ Eberhard Karls University Tübingen, Environmental Toxicology, Center for Applied Geosciences, 72074 Tübingen, Germany.¹⁵ MTM Research Centre, School of Science and Technology, Örebro University, Fakultetsgatan 1, 70182 Örebro, Sweden.¹⁶ Faculty of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Applied Sciences Darmstadt, Stephanstrasse 7, 64295 Darmstadt, Germany. ¹⁷ Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Überlandstrasse 133, 8600 Dübendorf, Switzerland.¹⁸ Zebrafishlab, Veterinary Physiology and Biochemistry, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium.¹⁹ Institute for Biology II, Department of Chemosensation, RWTH Aachen University, Aachen, Germany. ²⁰ Zweckverband Landeswasserversorgung, Langenau, Germany. ²¹ Department of Bioanalytical Ecotoxicology, UFZ-Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany.²² Department of Environmental Toxicology, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Eawag, Dübendorf 8600, Switzerland.²³ Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, McGill University, Montreal, Canada.²⁴ Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing, USA.²⁵ Institute of Physiology (Neurophysiology), Aachen, Germany.²⁶ Section Toxicology of Drinking Water and Swimming Pool Water, Federal Environment Agency (UBA), Heinrich-Heine-Str. 12, 08645 Bad Elster, Germany.

Acknowledgements

We thank the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) founded project NeuroBox and the Norman Network (http://www.norman-netwo rk.com/) for funding this study. Additionally, this work was conducted within the framework of the Joint Research Program of the Dutch Water companies (BTO2018-2023) and the SOLUTIONS project (European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under Grant Agreement No. 603437). Henner Hollert is Editor-in-Chief of this Journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable; presented information is based on previously published data only.

Consent for publication

Not applicable.

E.P.A. disclaimer

The views expressed in this paper are those of the authors and do not necessarily represent the views or policies of the U.S. Environmental Protection Agency.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 18 September 2018 Accepted: 31 October 2018 Published online: 14 December 2018

References

- 1. Hellou J (2011) Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. Environ Sci Pollut Res Int 18:1–11
- Scott GR, Sloman KA (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. Aquat Toxicol 68:369–392
- Basu N (2012) Piscivorous mammalian wildlife as sentinels of methylmercury exposure and neurotoxicity in humans. In: Ceccatelli S, Aschner M (eds) Methylmercury and neurotoxicity. Springer, Boston, pp 357–370
- 4. Basu N, Head J (2010) Mammalian wildlife as complementary models in environmental neurotoxicology. Neurotoxicol Teratol 32:114–119
- Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). Nucleic Acids Res 32:4100–4108
- Wright RO, Baccarelli A (2007) Metals and neurotoxicology. J Nutr 137:2809–2813
- Brack W, Ait-Aissa S, Burgess RM, Busch W, Creusot N, Di Paolo C et al (2016) Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments—an in-depth overview. Sci Total Environ 544:1073–1118
- Tilson HA, MacPhail RC, Crofton KM (1995) Defining neurotoxicity in a decision-making context. Neurotoxicology 16:363–375
- National Research Council (US) (2014) Committee on neurotoxicology and models for assessing risk. Environmental neurotoxicology. National Academies Press (US), Washington (DC)
- 11. Westerink RHS (2013) Do we really want to REACH out to in vitro? Neurotoxicology 39:169–172
- for Economic Co-operation O, Development. Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents. OECD Publishing; 1997
- for Economic Co-operation O, Development. Test No. 418: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances following acute exposure. OECD Publishing; 1995
- for Economic Co-operation O, Development. Test No. 419: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances: 28-day repeated dose study. OECD Publishing; 1995
- 15. for Economic Co-operation O, Development. Test No. 426: Developmental neurotoxicity study. OECD Publishing; 2007

- 16. Forum USEPARA. Guidelines for neurotoxicity risk assessment. Risk Assessment Forum, US Environmental Protection Agency; 1998
- 17. Sastre S, Fernández Torija C, Atiénzar Pertusa I, Beltrán EM, Pablos MV, González-Doncel M (2018) Stage-dependent effects of chlorpyrifos on medaka (Oryzias latipes) swimming behavior using a miniaturized swim flume. Aquat Toxicol 200:37–49
- de Melo Tarouco F, de Godoi FGA, Velasques RR, da Silveira Guerreiro A, Geihs MA, da Rosa CE (2017) Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta Laeonereis acuta: cholinesterases and oxidative stress. Ecotoxicol Environ Saf 135:259–266
- Larsen KE, Lifschitz AL, Lanusse CE, Virkel GL (2016) The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. Environ Toxicol Pharmacol 45:41–44
- 20. Oliveira C, Almeida JR, Guilhermino L, Soares AMVM, Gravato C (2013) Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. Chemosphere 90:936–944
- Almeida JR, Oliveira C, Gravato C, Guilhermino L (2010) Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. Ecotoxicology 19:1369–1381
- 22. Walker CH (2003) Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. Ecotoxicology 12:307–316
- Masjosthusmann S, Barenys M, El-Gamal M, Geerts L, Gerosa L, Gorreja A et al (2018) Literature review and appraisal on alternative neurotoxicity testing methods. EFSA Support Publ 15:1410E
- 24. European Commission. Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 2012
- 25. Escher B, Leusch F (2011) Bioanalytical tools in water quality assessment. IWA Publishing, London
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002) Something from "nothing"eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ Sci Technol 36:1751–1756
- Escher BI, Fenner K (2011) Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. Environ Sci Technol 45:3835–3847
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57–149
- 29. Hollender J, Schymanski EL, Singer HP, Ferguson PL (2017) Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: ready to go? Environ Sci Technol 51:11505–11512
- TrinkwV (2001) "Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBI. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. January 2018 (BGBI. I S. 99) geändert worden ist. BoD—Books on Demand; 2018
- Appleton AA, Jackson BP, Karagas M, Marsit CJ (2017) Prenatal exposure to neurotoxic metals is associated with increased placental glucocorticoid receptor DNA methylation. Epigenetics. 12:607–615
- 32. Grummt T, Kuckelkorn J et al (2013) Tox-Box: securing drops of life—an enhanced health-related approach for risk assessment of drinking water in Germany. Environ Sci Europe. 25:27
- Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environ Health Perspect 108(Suppl 3):511–533
- Grandjean P, Landrigan PJ (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. Lancet 368:2167–2178
- 35. Makris SL, Raffaele K, Allen S, Bowers WJ, Hass U, Alleva E et al (2009) A retrospective performance assessment of the developmental neurotoxicity study in support of OECD test guideline 426. Environ Health Perspect 117:17–25
- 36. Crofton KM, Mundy WR, Shafer TJ (2012) Developmental neurotoxicity testing: a path forward. Congenit Anom. 52:140–146
- Fritsche E, Grandjean P, Crofton KM, Aschner M, Goldberg A, Heinonen T et al (2018) Consensus statement on the need for innovation, transition and implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes. Toxicol Appl Pharmacol. https://doi.org/10.1016/j. taap.2018.02.004
- Basu N (2015) Applications and implications of neurochemical biomarkers in environmental toxicology. Environ Toxicol Chem 34:22–29

- Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW et al (2009) Use of medaka in toxicity testing. Curr Protoc Toxicol. 1:10
- Ton C, Lin Y, Willett C (2006) Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 76:553–567
- Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, Sasagawa S, Umemoto N, Shimada Y et al (2015) Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. Congenit Anom. 55:1–16
- Buznikov GA, Nikitina LA, Bezuglov W, Lauder JM, Padilla S, Slotkin TA (2001) An invertebrate model of the developmental neurotoxicity of insecticides: effects of chlorpyrifos and dieldrin in sea urchin embryos and larvae. Environ Health Perspect 109:651–661
- 43. Buznikov GA, Nikitina LA, Rakić LM, Milošević I, Bezuglov VV, Lauder JM et al (2007) The sea urchin embryo, an invertebrate model for mammalian developmental neurotoxicity, reveals multiple neurotransmitter mechanisms for effects of chlorpyrifos: therapeutic interventions and a comparison with the monoamine depleter, reserpine. Brain Res Bull 74:221–231
- 44. Hicks C, Sorocco D, Levin M (2006) Automated analysis of behavior: a computer-controlled system for drug screening and the investigation of learning. J Neurobiol 66:977–990
- Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M et al (2008) Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. Toxicol Sci 106:5–28
- 46. Bradley M, Rutkiewicz J, Mittal K, Fernie K, Basu N (2015) In ovo exposure to organophosphorous flame retardants: survival, development, neurochemical, and behavioral changes in white leghorn chickens. Neurotoxicol Teratol 52:228–235
- Rutkiewicz J, Bradley M, Mittal K, Basu N (2013) Methylmercury egg injections: part 2—pathology, neurochemistry, and behavior in the avian embryo and hatchling. Ecotoxicol Environ Saf 93:77–86
- Escher BI, Hermens JLM (2002) Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. Environ Sci Technol 36:4201–4217
- Ashauer R, Jager T (2018) Physiological modes of action across species and toxicants: the key to predictive ecotoxicology. Environ Sci Process Impacts. 20:48–57
- 50. Jablonka E, Lamb MJ (2002) The changing concept of epigenetics. Ann N Y Acad Sci 981:82–96
- 51. Bollati V, Baccarelli A (2010) Environmental epigenetics. Heredity 105:105–112
- 52. Perera F, Herbstman J (2011) Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. Reprod Toxicol 31:363–373
- Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK (2010) Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. PLoS ONE. https://doi.org/10.1371/journ al.pone.0013100
- Hemberger M, Dean W, Reik W (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. Nat Rev Mol Cell Biol 10:526–537
- 55. Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 3:662–673
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293:1089–1093
- 57. Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. Science 330:622–627
- Potok ME, Nix DA, Parnell TJ, Cairns BR (2013) Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. Cell 153:759–772
- Fellous A, Earley R, Silvestre F (2018) DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. Ecol Evol 8:6016
- Banik A, Kandilya D, Ramya S, Stünkel W, Chong YS, Dheen ST (2017) Maternal factors that induce epigenetic changes contribute to neurological disorders in offspring. Genes. https://doi.org/10.3390/genes 8060150
- 61. Feng J, Fouse S, Fan G (2007) Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. Pediatr Res 61:58R–63R
- 62. Raciti M, Ceccatelli S (2018) Epigenetic mechanisms in developmental neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol 66:94–101
- 63. Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Narita M, Hirabayashi Y (2017) Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during

development—bisphenol A and valproic acid may have epigenetic effects. Food Chem Toxicol 109:812–816

- 64. Thirtamara Rajamani K, Doherty-Lyons S, Bolden C, Willis D, Hoffman C, Zelikoff J et al (2013) Prenatal and early-life exposure to high-level diesel exhaust particles leads to increased locomotor activity and repetitive behaviors in mice: diesel exhaust particles and autism. Autism Res. 6:248–257
- Yokota S, Mizuo K, Moriya N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K (2009) Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. Neurosci Lett 449:38–41
- Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K (2013) Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. J Toxicol Sci 38:13–23
- 67. Yokota S, Takashima H, Ohta R, Saito Y, Miyahara T, Yoshida Y et al (2011) Nasal instillation of nanoparticle-rich diesel exhaust particles slightly affects emotional behavior and learning capability in rats. J Toxicol Sci 36:267–276
- Shaw JLA, Judy JD, Kumar A, Bertsch P, Wang M-B, Kirby JK (2017) Incorporating transgenerational epigenetic inheritance into ecological risk assessment frameworks. Environ Sci Technol 51:9433–9445
- Klengel T, Dias BG, Ressler KJ (2016) Models of intergenerational and transgenerational transmission of risk for psychopathology in mice. Neuropsychopharmacology 41:219–231
- Knecht AL, Truong L, Simonich MT, Tanguay RL (2017) Developmental benzo[a]pyrene (B[a]P) exposure impacts larval behavior and impairs adult learning in zebrafish. Neurotoxicol Teratol 59:27–34
- Carvan MJ 3rd, Kalluvila TA, Klingler RH, Larson JK, Pickens M, Mora-Zamorano FX et al (2017) Mercury-induced epigenetic transgenerational inheritance of abnormal neurobehavior is correlated with sperm epimutations in zebrafish. PLoS ONE 12:e0176155
- 72. Aschner M (2002) Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. Environ Toxicol Pharmacol 12:101–104
- Beauvais SL, Jones SB, Parris JT, Brewer SK, Little EE (2001) Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol Environ Saf 49:84–90
- 74. Bush J, Moffatt S, Dunn C (2001) 'Even the birds round here cough': stigma, air pollution and health in Teesside. Health Place. 7:47–56
- Llacuna S, Gorriz A, Sanpera C, Nadal J (1995) Metal accumulation in three species of passerine birds (Emberiza cia, Parus major, and *Turdus merula*) subjected to air pollution from a coal-fired power plant. Arch Environ Contam Toxicol 28:298–303
- 76. Richard Pilsner J, Lazarus AL, Nam D-H, Letcher RJ, Sonne C, Dietz R et al (2010) Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUminometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. Mol Ecol 19:307–314
- 77. Carpenter DO (2001) Effects of metals on the nervous system of humans and animals. Int J Occup Med Environ Health 14:209–218
- Basu N, Head J, Nam D-H, Pilsner JR, Carvan MJ, Chan HM et al (2013) Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken and yellow perch. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol 157:322–327
- 79. Harris KDM, Bartlett NJ, Lloyd VK (2012) Daphnia as an emerging epigenetic model organism. Genet Res Int. 2012:147892
- Sih A, Bell A, Johnson JC (2004) Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. Trends Ecol Evol 19:372–378
- Verhoeven KJF, vonHoldt BM, Sork VL (2016) Epigenetics in ecology and evolution: what we know and what we need to know. Mol Ecol 25:1631–1638
- 82. Porterfield SP (2000) Thyroidal dysfunction and environmental chemicals–potential impact on brain development. Environ Health Perspect 108(Suppl 3):433–438
- Colborn T (2004) Neurodevelopment and endocrine disruption. Environ Health Perspect 112:944–949
- Brouwer A, Longnecker MP, Birnbaum LS, Cogliano J, Kostyniak P, Moore J et al (1999) Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. Environ Health Perspect 107(Suppl 4):639–649
- 85. Modesto T, Tiemeier H, Peeters RP, Jaddoe VWV, Hofman A, Verhulst FC et al (2015) Maternal mild thyroid hormone insufficiency in early pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in children. JAMA Pediatr. 169:838–845

- Román GC, Ghassabian A, Bongers-Schokking JJ, Jaddoe VWV, Hofman A, de Rijke YB et al (2013) Association of gestational maternal hypothyroxinemia and increased autism risk. Ann Neurol 74:733–742
- Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd K, Zoeller TR, Organization WH et al. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision-makers. World Health Organization; 2013. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO_HSE_PHE_ IHE_2013.1_eng.pdf
- Crews D, Gore AC (2011) Life imprints: living in a contaminated world. Environ Health Perspect 119:1208–1210
- van der Ven K, Keil D, Moens LN, Hummelen PV, van Remortel P, Maras M et al (2006) Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: molecular markers of endocrine disruption. Chemosphere 65:1836–1845
- 90. Ferraz da Silva I, Freitas-Lima LC, Graceli JB, Rodrigues LCM (2017) Organotins in neuronal damage, brain function, and behavior: a short review. Front Endocrinol. 8:366
- Du Z-H, Xia J, Sun X-C, Li X-N, Zhang C, Zhao H-S et al (2017) A novel nuclear xenobiotic receptors (AhR/PXR/CAR)-mediated mechanism of DEHP-induced cerebellar toxicity in quails (*Coturnix japonica*) via disrupting CYP enzyme system homeostasis. Environ Pollut 226:435–443
- Zoeller RT, Crofton KM (2000) Thyroid hormone action in fetal brain development and potential for disruption by environmental chemicals. Neurotoxicology 21:935–945
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M et al (2012) Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. J Neuroendocrinol 24:144–159
- Campinho MA, Saraiva J, Florindo C, Power DM (2014) Maternal thyroid hormones are essential for neural development in zebrafish. Mol Endocrinol 28:1136–1149
- 95. Wang F, Fang M, Hinton DE, Chernick M, Jia S, Zhang Y et al (2018) Increased coiling frequency linked to apoptosis in the brain and altered thyroid signaling in zebrafish embryos (*Danio rerio*) exposed to the PBDE metabolite 6-OH-BDE-47. Chemosphere 198:342–350
- Wang Q, Lai NL-S, Wang X, Guo Y, Lam PK-S, Lam JC-W et al (2015) Bioconcentration and transfer of the organophorous flame retardant 1,3-dichloro-2-propyl phosphate causes thyroid endocrine disruption and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. Environ Sci Technol 49:5123–5132
- 97. Chen X, Huang C, Wang X, Chen J, Bai C, Chen Y et al (2012) BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. Aquat Toxicol 120–121:35–44
- Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. Trends Neurosci 37:264–278
- 99. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. Trends Pharmacol Sci 35:63–75
- Denver RJ, Pavgi S, Shi YB (1997) Thyroid hormone-dependent gene expression program for Xenopus neural development. J Biol Chem 272:8179–8188
- Ehrsam M, Knutie SA, Rohr JR (2016) The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. Environ Toxicol Chem 35:2239–2244
- 102. Balbi T, Franzellitti S, Fabbri R, Montagna M, Fabbri E, Canesi L (2016) Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects on gene transcription. Environ Pollut 218:996–1004
- 103. Matsushima A, Ryan K, Shimohigashi Y, Meinertzhagen IA (2013) An endocrine disruptor, bisphenol A, affects development in the protochordate *Ciona intestinalis*: hatching rates and swimming behavior alter in a dose-dependent manner. Environ Pollut 173:257–263
- 104. Amaral Mendes JJ (2002) The endocrine disrupters: a major medical challenge. Food Chem Toxicol 40:781–788
- 105. Segner H, Caroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D et al (2003) Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotoxicol Environ Saf 54:302–314

- 107. Fent K (2004) Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology 205:223–240
- Schmidt K, Staaks GBO, Pflugmacher S, Steinberg CEW (2005) Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). Aquat Toxicol 71:49–59
- 109. Casida JE (2009) Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. Chem Res Toxicol 22:609–619
- 110. Timbrell JA (2008) Principles of biochemical toxicology. CRC Press, New York
- 111. Bloomquist JR (1996) Ion channels as targets for insecticides. Annu Rev Entomol 41:163–190
- Narahashi T, Frey JM, Ginsburg KS, Roy ML (1992) Sodium and GABAactivated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. Toxicol Lett 64:429–436
- Casida JE (1993) Insecticide action at the GABA-gated chloride channel: recognition, progress, and prospects. Arch Insect Biochem Physiol 22:13–23
- Casida JE (2018) Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. Annu Rev Entomol 63:125–144
- Blacquière T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology 21:973–992
- 116. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C et al (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. Environ Sci Pollut Res Int 22:5–34
- 117. Kretschmann A, Ashauer R, Hitzfeld K, Spaak P, Hollender J, Escher BI (2011) Mechanistic toxicodynamic model for receptor-mediated toxicity of diazoxon, the active metabolite of diazinon, in Daphnia magna. Environ Sci Technol 45:4980–4987
- de Bruijn J, Hermens J (1991) Qualitative and quantitative modelling of toxic effects of organophosphorous compounds to fish. Sci Total Environ 109–110:441–455
- 119. Keizer J, D'Agostino G, Nagel R, Volpe T, Gnemi P, Vittozzi L (1995) Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. Sci Total Environ 171:213–220
- Kretschmann A, Ashauer R, Preuss TG, Spaak P, Escher BI, Hollender J (2011) Toxicokinetic model describing bioconcentration and biotransformation of diazinon in Daphnia magna. Environ Sci Technol 45:4995–5002
- 121. Ashauer R, Hintermeister A, Caravatti I, Kretschmann A, Escher BI (2010) Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environ Sci Technol 44:3963–3971
- 122. Ashauer R, O'Connor I, Escher BI (2017) Toxic mixtures in time-the sequence makes the poison. Environ Sci Technol 51:3084–3092
- 123. Bal-Price A, Hogberg HT, Crofton KM, Daneshian M, FitzGerald RE, Fritsche E et al (2018) Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: exemplified for developmental neurotoxicity. Altex. https://doi.org/10.14573/altex.1712081
- 124. de Groot MWGDM, Westerink RHS, Dingemans MML (2013) Don't judge a neuron only by its cover: neuronal function in in vitro developmental neurotoxicity testing. Toxicol Sci 132:1–7
- 125. Legradi J, van Pomeren M, Dahlberg A-K, Legler J (2017) Effects of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in developing zebrafish are indicative of disruption of oxidative phosphorylation. Int J Mol Sci. https://doi.org/10.3390/ijms18050970
- 126. Racz PI, Wildwater M, Rooseboom M, Kerkhof E, Pieters R, Yebra-Pimentel ES et al (2017) Application of *Caenorhabditis elegans* (nematode) and *Danio rerio* embryo (zebrafish) as model systems to screen for developmental and reproductive toxicity of Piperazine compounds. Toxicol In Vitro 44:11–16
- 127. van der Oost R, Sileno G, Suárez-Muñoz M, Nguyen MT, Besselink H, Brouwer A (2017) SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel

bioanalytical strategy for water quality assessment: part I—model design and effect-based trigger values. Environ Toxicol Chem 36:2385–2399

- 128. Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuellen T et al (2018) Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. Stem Cell Rep 8:1144–1154
- 129. Tukker AM, van Groot MWGDM, Wijnolts FMJ, Kasteel EEJ, Hondebrink L, Westerink RHS (2016) Is the time right for in vitro neurotoxicity testing using human iPSC-derived neurons? ALTEX 33:261–271
- Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuellen T et al (2017) Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. Stem Cell Rep 8:1144–1154
- 131. Maltby L, Blake N, Brock TCM, van den Brink PJ (2005) Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. Environ Toxicol Chem 24:379–388
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Curr Neuropharmacol 11:315–335
- Olsen ML, Khakh BS, Skatchkov SN, Zhou M, Lee CJ, Rouach N (2015) New insights on astrocyte ion channels: critical for homeostasis and neuron-glia signaling. J Neurosci 35:13827–13835
- 134. Aschner M, Ceccatelli S, Daneshian M, Fritsche E, Hasiwa N, Hartung T et al (2017) Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use. Altex 34:49–74
- Pei Y, Peng J, Behl M, Sipes NS, Shockley KR, Rao MS et al (2016) Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. Brain Res 1638:57–73
- 136. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol 27:275–280
- Hayess K, Riebeling C, Pirow R, Steinfath M, Sittner D, Slawik B et al (2013) The DNT-EST: a predictive embryonic stem cell-based assay for developmental neurotoxicity testing in vitro. Toxicology 314:135–147
- 138. Wu X, Yang X, Majumder A, Swetenburg R, Goodfellow FT, Bartlett MG et al (2017) From the cover: astrocytes are protective against chlorpyrifos developmental neurotoxicity in human pluripotent stem cell-derived astrocyte-neuron cocultures. Toxicol Sci 157:410–420
- 139. Singh S, Srivastava A, Kumar V, Pandey A, Kumar D, Rajpurohit CS et al (2016) Stem cells in neurotoxicology/developmental neurotoxicology: current scenario and future prospects. Mol Neurobiol 53:6938–6949
- 140. Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Dolan ME (2015) Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells. PLoS ONE 10:e0118020
- 141. Ryan KR, Sirenko O, Parham F, Hsieh J-H, Cromwell EF, Tice RR et al (2016) Neurite outgrowth in human induced pluripotent stem cellderived neurons as a high-throughput screen for developmental neurotoxicity or neurotoxicity. Neurotoxicology 53:271–281
- Meamar R, Dehghani L, Karamali F (2012) Toxicity effects of methamphetamine on embryonic stem cell-derived neuron. J Res Med Sci 17:470–474
- Cao WS, Livesey JC, Halliwell RF (2015) An evaluation of a human stem cell line to identify risk of developmental neurotoxicity with antiepileptic drugs. Toxicol In Vitro 29:592–599
- Hubbard K, Beske P, Lyman M, McNutt P (2015) Functional evaluation of biological neurotoxins in networked cultures of stem cell-derived central nervous system neurons. J Vis Exp. https://doi.org/10.3791/52361
- Rocha RA, Gimeno-Alcañiz JV, Martín-Ibañez R, Canals JM, Vélez D, Devesa V (2011) Arsenic and fluoride induce neural progenitor cell apoptosis. Toxicol Lett 203:237–244
- Gjorevski N, Ranga A, Lutolf MP (2014) Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis. Development 141:1794–1804
- Lee C-T, Bendriem RM, Wu WW, Shen R-F (2017) 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. J Biomed Sci 24:59
- McComish SF, Caldwell MA (2018) Generation of defined neural populations from pluripotent stem cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0214
- 149. Frega M, van Gestel SHC, Linda K, van der Raadt J, Keller J, Van Rhijn J-R et al (2017) Rapid neuronal differentiation of induced pluripotent stem

- 150. Ogorevc J, Orehek S, Dovč P (2016) Cellular reprogramming in farm animals: an overview of iPSC generation in the mammalian farm animal species. J Anim Sci Biotechnol 7:10
- 151. Betts DH, Tobias IC (2015) Canine pluripotent stem cells: are they ready for clinical applications? Front Vet Sci 2:41
- Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ (2013) Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. Bioresrourc Open Access 2:72–76
- 153. Ramaswamy K, Yik WY, Wang X-M, Oliphant EN, Lu W, Shibata D et al (2015) Derivation of induced pluripotent stem cells from orangutan skin fibroblasts. BMC Res Notes 8:577
- 154. Transdifferentiation—Latest research and news. Nature https://www. nature.com/subjects/transdifferentiation. Accessed 3 Aug 2018
- 155. Arini A, Mittal K, Basu N (2018) Cell-free assays in environmental toxicology. In: Garcia-Reyero N, Murphy CA (eds) A systems biology approach to advancing adverse outcome pathways for risk assessment. Springer International Publishing, Cham, pp 31–41
- Arini A, Mittal K, Dornbos P, Head J, Rutkiewicz J, Basu N (2017) A cell-free testing platform to screen chemicals of potential neurotoxic concern across twenty vertebrate species. Environ Toxicol Chem 36:3081–3090
- 157. Basu N, Ta CA, Waye A, Mao J, Hewitt M, Arnason JT et al (2009) Pulp and paper mill effluents contain neuroactive substances that potentially disrupt neuroendocrine control of fish reproduction. Environ Sci Technol 43:1635–1641
- 158. Arini A, Cavallin JE, Berninger JP, Marfil-Vega R, Mills M, Villeneuve DL et al (2016) In vivo and In vitro neurochemical-based assessments of wastewater effluents from the Maumee River area of concern. Environ Pollut 211:9–19
- 159. Tierney KB, Baldwin DH, Hara TJ, Ross PS, Scholz NL, Kennedy CJ (2010) Olfactory toxicity in fishes. Aquat Toxicol 96:2–26
- 160. Ottoson D (1955) Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. Acta Physiol Scand Suppl 35:1–83
- Caprio J (1988) Peripheral filters and chemoreceptor cells in fishes. Sensory biology of aquatic animals. Springer, New York, pp 313–338
- 162. Carr WES (1988) The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment. In: Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN (eds) Sensory biology of aquatic animals. Springer, New York, pp 3–27
- 163. Zhu P, Fajardo O, Shum J, Zhang Schärer Y-P, Friedrich RW (2012) Highresolution optical control of spatiotemporal neuronal activity patterns in zebrafish using a digital micromirror device. Nat Protoc 7:1410–1425
- Tabor R, Yaksi E, Weislogel J-M, Friedrich RW (2004) Processing of odor mixtures in the zebrafish olfactory bulb. J Neurosci 24:6611–6620
- Baier H, Korsching S (1994) Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. J Neurosci 14:219–230
- 166. Friedrich RW, Wiechert MT (2014) Neuronal circuits and computations: pattern decorrelation in the olfactory bulb. FEBS Lett 588:2504–2513
- 167. Sato Y, Miyasaka N, Yoshihara Y (2007) Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. J Neurosci 27:1606–1615
- Saraiva LR, Ahuja G, Ivandic I, Syed AS, Marioni JC, Korsching SI et al (2015) Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. Sci Rep 5:11487
- 169. Packard A, Schnittke N, Romano R-A, Sinha S, Schwob JE (2011) DeltaNp63 regulates stem cell dynamics in the mammalian olfactory epithelium. J Neurosci 31:8748–8759
- 170. Schnittke N, Herrick DB, Lin B, Peterson J, Coleman JH, Packard Al et al (2015) Transcription factor p63 controls the reserve status but not the stemness of horizontal basal cells in the olfactory epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 112:E5068–E5077
- 171. Grant WM, Thomas CC. Toxicology of the eye, third edition. J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol. Taylor & Francis; 1987;6: 155–156
- 172. Fox DA (2015) Retinal and visual system: occupational and environmental toxicology. Handb Clin Neurol. 131:325–340
- Matsui JI, Egana AL, Sponholtz TR, Adolph AR, Dowling JE (2006) Effects of ethanol on photoreceptors and visual function in developing zebrafish. Invest Ophthalmol Vis Sci 47:4589–4597

- 174. Mela M, Cambier S, Mesmer-Dudons N, Legeay A, Grötzner SR, de Oliveira Ribeiro CA et al (2010) Methylmercury localization in Danio rerio retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. Neurotoxicology 31:448–453
- Mela M, Grötzner SR, Legeay A, Mesmer-Dudons N, Massabuau J-C, Ventura DF et al (2012) Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. Neurotoxicology 33:407–415
- 176. Tanan CL, Ventura DF, de Souza JM, Grotzner SR, Mela M, Gouveia A Jr et al (2006) Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of thraira fish (*Hoplias malabaricus*). Braz J Med Biol Res 39:987–995
- Quintaneiro C, Soares AMVM, Monteiro MS (2018) Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. Chemosphere 194:595–601
- 178. Roy NM, Carneiro B, Ochs J (2016) Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. Environ Toxicol Pharmacol 42:45–54
- Marigoudar SR, Mohan D, Nagarjuna A, Karthikeyan P (2018) Biomarker and histopathological responses of *Lates calcarifer* on exposure to sub lethal concentrations of chlorpyrifos. Ecotoxicol Environ Saf 148:327–335
- 180. Kirla KT, Groh KJ, Steuer AE, Poetzsch M, Banote RK, Stadnicka-Michalak J et al (2016) From the cover: zebrafish larvae are insensitive to stimulation by cocaine: importance of exposure route and toxicokinetics. Toxicol Sci 154:183–193
- 181. Perlman I (2018) The electroretinogram: ERG in Webvision: the organization of the retina and visual system. Moran Eye Center, Lake
- 182. Seeliger MW, Rilk A, Neuhauss SCF (2002) Ganzfeld ERG in zebrafish larvae. Doc Ophthalmol 104:57–68
- Schuster S, Machnik P, Schulze W (2011) Behavioral assessment of the visual capabilities of fish. Encyclop Fish Physiol 1:143–149
- Brockerhoff SE (2006) Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. Nat Protoc 1:2448–2451
- Maurer CM, Huang Y-Y, Neuhauss SCF (2011) Application of zebrafish oculomotor behavior to model human disorders. Rev Neurosci 22:5–16
- 186. Neuhauss SCF (2003) Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish. J Neurobiol 54:148–160
- Steyger PS, Cunningham LL, Esquivel CR, Watts KL, Zuo J (2018) Editorial: cellular mechanisms of ototoxicity. Front Cell Neurosci 12:75
- Coffin AB, Ramcharitar J (2016) Chemical ototoxicity of the fish inner ear and lateral line. Adv Exp Med Biol 877:419–437
- McNeil PL, Boyle D, Henry TB, Handy RD, Sloman KA (2014) Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol 152:318–323
- Olivari FA, Hernández PP, Allende ML (2008) Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. Brain Res 1244:1–12
- 191. Bhandiwad AA, Zeddies DG, Raible DW, Rubel EW, Sisneros JA (2013) Auditory sensitivity of larval zebrafish (Danio rerio) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. J Exp Biol 216:3504–3513
- Buck LMJ, Winter MJ, Redfern WS, Whitfield TT (2012) Ototoxin-induced cellular damage in neuromasts disrupts lateral line function in larval zebrafish. Hear Res 284:67–81
- 193. Liu X, Lin J, Zhang Y, Guo N, Li Q (2018) Sound shock response in larval zebrafish: a convenient and high-throughput assessment of auditory function. Neurotoxicol Teratol 66:1–7
- 194. Groneberg AH, Herget U, Ryu S, De Marco RJ (2015) Positive taxis and sustained responsiveness to water motions in larval zebrafish. Front Neural Circuits 9:9
- Olive R, Wolf S, Dubreuil A, Bormuth V, Debrégeas G, Candelier R (2016) Rheotaxis of larval zebrafish: behavioral study of a multi-sensory process. Front Syst Neurosci 10:14
- Oteiza P, Odstrcil I, Lauder G, Portugues R, Engert F (2017) A novel mechanism for mechanosensory-based rheotaxis in larval zebrafish. Nature 547:445–448
- Stengel D, Zindler F, Braunbeck T (2017) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (Danio rerio) embryos. Comp Biochem Physiol C 193:18–29
- Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SCF, Segner H, Eggen RIL (2009) Zebrafish (Danio rerio) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. Aquat Toxicol 95:307–319

- 200. Stengel D, Wahby S, Braunbeck T (2018) In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ Sci Pollut Res Int 25:4066–4084
- 201. Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. Neuron 73:862–885
- 202. Renninger SL, Orger MB (2013) Two-photon imaging of neural population activity in zebrafish. Methods 62:255–267
- vom Berg-Maurer CM, Trivedi CA, Bollmann JH, De Marco RJ, Ryu S (2016) The severity of acute stress is represented by increased synchronous activity and recruitment of hypothalamic CRH neurons. J Neurosci 36:3350–3362
- 204. Del Bene F, Wyart C (2012) Optogenetics: a new enlightenment age for zebrafish neurobiology. Dev Neurobiol 72:404–414
- 205. Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL (2016) Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. Pharmacol Ther 161:11–21
- Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, Cheung CYJ, Mateus R et al (2010) Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. Nat Chem Biol 6:231–237
- Noyes PD, Haggard DE, Gonnerman GD, Tanguay RL (2015) Advanced morphological—behavioral test platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed to comprehensive suite of halogenated and organophosphate flame retardants. Toxicol Sci 145:177–195
- Reif DM, Truong L, Mandrell D, Marvel S, Zhang G, Tanguay RL (2016) High-throughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes. Arch Toxicol 90:1459–1470
- Triebskorn R, Adam S, Casper H, Honnen W, Pawert M, Schramm M et al (2002) Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. Ecotoxicology 11:451–465
- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar Environ Res 44:69–84
- 211. Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, Chowdhuri DK (2003) Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. J Biochem Mol Toxicol 17:249–254
- 212. Rank J, Lehtonen KK, Strand J, Laursen M (2007) DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. Aquat Toxicol 84:50–61
- 213. Fossi MC (1994) Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. Environ Health Perspect 102(Suppl 12):49–54
- 214. Allner B, Hennies M, Lerche CF, Schmidt T, Schneider K, Willner M et al (2016) Kinetic determination of vitellogenin induction in the epidermis of cyprinid and perciform fishes: evaluation of sensitive enzyme-linked immunosorbent assays. Environ Toxicol Chem 35:2916–2930
- Küster E, Altenburger R (2006) Comparison of cholin- and carboxylesterase enzyme inhibition and visible effects in the zebra fish embryo bioassay under short-term paraoxon-methyl exposure. Biomarkers 11:341–354
- Whitehead A, Anderson SL, Ramirez A, Wilson BW (2005) Cholinesterases in aquatic biomonitoring: assay optimization and species-specific characterization for a California native fish. Ecotoxicology 14:597–606
- 217. Kretschmann A, Ashauer R, Hollender J, Escher BI (2012) Toxicokinetic and toxicodynamic model for diazinon toxicity—mechanistic explanation of differences in the sensitivity of *Daphnia magna* and *Gammarus pulex*. Environ Toxicol Chem 31:2014–2022
- 218. Barriga-Vallejo C, Aguilera C, Cruz J, Banda-Leal J, Lazcano D, Mendoza R (2017) Ecotoxicological biomarkers in multiple tissues of the neotenic *Ambystoma* spp. for a non-lethal monitoring of contaminant exposure in wildlife and captive populations. Water Air Soil Pollut Focus. 228:415
- 219. Troiano AT, Grue CE (2016) Plasma cholinesterase activity as a biomarker for quantifying exposure of green sturgeon to carbaryl following applications to control burrowing shrimp in Washington State. Environ Toxicol Chem 35:2003–2015

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88–95
- 221. Neale PA, Escher BI (2013) Coextracted dissolved organic carbon has a suppressive effect on the acetylcholinesterase inhibition assay. Environ Toxicol Chem 32:1526–1534
- 222. Mineau P (Canadian Wildlife Service, Ottawa (Canada). National Wildlife Research Centre). Cholinesterase-inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment. Chemicals in Agriculture (Netherlands). Elsevier; 1991. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recor dID=NL9204434
- 223. Gagné F, Blaise C (2003) Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel Elliptio complanata. Comp Biochem Physiol C 136:117–125
- 224. Gagné F, Cejka P, André C, Hausler R, Blaise C (2007) Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. Comp Biochem Physiol C 146:460–470
- Le Page Y, Vosges M, Servili A, Brion F, Kah O (2011) Neuroendocrine effects of endocrine disruptors in teleost fish. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 14:370–386
- 226. Waye A, Trudeau VL (2011) Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 14:270–291
- 227. Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Míguez JM (2009) beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol Environ Saf 72:191–198
- Robinson PD (2009) Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). Can J Fish Aquat Sci 66:1179–1188
- 229. Van Der Geest HG, Greve GD, de Haas EM, Scheper BB, Kraak MHS, Stuijfzand SC et al (1999) Hydropsyche angustipennis to copper and diazinon. Environ Toxicol Chem 18:1965–1971
- 230. Kokel D, Peterson RT (2011) Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. Methods Cell Biol 105:517–524
- 231. Klüver N, König M, Ortmann J, Massei R, Paschke A, Kühne R et al (2015) 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 49:7002–7011
- 232. Valente A, Huang K-H, Portugues R, Engert F (2012) Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. Learn Mem 19:170–177
- Wang XH, Souders CL 2nd, Zhao YH, Martyniuk CJ (2018) Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (Danio rerio) after exposure to the bipyridylium herbicide diquat. Toxicol Lett 283:13–20
- 234. Vignet C, Le Menach K, Lyphout L, Guionnet T, Frère L, Leguay D et al (2014) Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish—part II: behavior. Environ Sci Pollut Res Int 21:13818–13832
- Vignet C, Trenkel VM, Vouillarmet A, Bricca G, Bégout M-L, Cousin X (2017) Changes in brain monoamines underlie behavioural disruptions after zebrafish diet exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons environmental mixtures. Int J Mol Sci. https://doi.org/10.3390/ijms18030560
- Hellou J, Cheeseman K, Desnoyers E, Johnston D, Jouvenelle M-L, Leonard J et al (2008) A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. Sci Total Environ 389:178–187
- 237. Sohn L, Brodie RJ, Couldwell G, Demmons E, Sturve J (2018) Exposure to a nicotinoid pesticide reduces defensive behaviors in a non-target organism, the rusty crayfish Orconectes rusticus. Ecotoxicology 27:900–907
- 238. Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F, Pereira JL (2018) Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. Aquat Toxicol 196:25–34
- Villa S, Di Nica V, Pescatore T, Bellamoli F, Miari F, Finizio A et al (2018) Comparison of the behavioural effects of pharmaceuticals and pesticides on *Diamesa zernyi* larvae (Chironomidae). Environ Pollut 238:130–139
- 240. Chevalier J, Harscoët E, Keller M, Pandard P, Cachot J, Grote M (2015) Exploration of Daphnia behavioral effect profiles induced by a broad

range of toxicants with different modes of action. Environ Toxicol Chem 34:1760–1769

- 241. Araújo CVM, Moreira-Santos M, Ribeiro R (2016) Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: a complementary perspective and a critical review. Environ Int 92–93:405–415
- 242. Rastetter N, Gerhardt A (2017) Continuous monitoring of avoidance behaviour with the earthworm *Eisenia fetida*. J Soils Sediments. https:// doi.org/10.1007/s11368-017-1791-4
- Mitzel MR, Lin N, Whalen JK, Tufenkji N (2017) Chlamydomonas reinhardtii displays aversive swimming response to silver nanoparticles. Environ Sci Nano 4:1328–1338
- 244. Martin P, Bateson PPG (1993) Measuring behaviour: an introductory guide. Cambridge University Press, London
- Langer-Jaesrich M, Kienle C, Köhler H-R, Gerhardt A (2010) Impairment of trophic interactions between zebrafish (*Danio rerio*) and midge larvae (*Chironomus riparius*) by chlorpyrifos. Ecotoxicology 19:1294–1301
- 246. Hunting ER, Mulder C, Kraak MHS, Breure AM, Admiraal W (2013) Effects of copper on invertebrate–sediment interactions. Environ Pollut 180:131–135
- 247. Gerhardt A, Svensson E (1994) Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. Environ International 20:209–219
- 248. Gerhardt A (1999) Recent trends in online biomonitoring for water quality control. Biomonitoring of polluted water reviews on actual topics environmental research forum. TTP Switzerland, Switzerland, pp 95–118
- Harrison JW, Beecraft L, Smith REH (2018) Implications of irradiance exposure and non-photochemical quenching for multi-wavelength (bbe FluoroProbe) fluorometry. J Photochem Photobiol B 189:36–48
- Lechelt M, Blohm W, Kirschneit B, Pfeiffer M, Gresens E, Liley J et al (2000) Monitoring of surface water by ultrasensitive *Daphnia toximeter*. Environ Toxicol 15:390–400
- Jou L-J, Lin S-C, Chen B-C, Chen W-Y, Liao C-M (2013) Synthesis and measurement of valve activities by an improved online clam-based behavioral monitoring system. Comput Electron Agric. 90:106–118
- Ragas A, Teuschler L, Posthuma L, Cowan C (2010) Human and ecological risk assessment of chemical mixtures. In: van Gestel C, Jonker M, Kammenga J, Laskowski R, Svendsen C (eds) Mixture toxicity. CRC Press, New York, pp 157–212
- Kortenkamp A, Altenburger R (2010) Toxicity from combined exposure to chemicals. In: van Gestel C, Jonker M, Kammenga J, Laskowski R, Svendsen C (eds) Mixture toxicity. CRC Press, New York, pp 95–119
- 254. Backhaus T, Faust M (2012) Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. Environ Sci Technol 46:2564–2573
- 255. Kim S, Ji K, Lee S, Lee J, Kim J, Kim S et al (2011) Perfluorooctane sulfonic acid exposure increases cadmium toxicity in early life stage of zebrafish, *Danio rerio*. Environ Toxicol Chem 30:870–877
- 256. Fritsche E, Alm H, Baumann J, Geerts L, Håkansson H, Masjosthusmann S et al (2015) Literature review on in vitro and alternative developmental neurotoxicity (DNT) testing methods. EFSA Supporting Publications. Wiley Online Library, vol 12. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/ sp.efsa.2015.EN-778/full
- 257. Grandjean P, Landrigan PJ (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. Lancet Neurol 13:330–338
- Relyea RA (2009) A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. Oecologia 159:363–376
- 259. Scholz NL, Truelove NK, Labenia JS, Baldwin DH, Collier TK (2006) Doseadditive inhibition of chinook salmon acetylcholinesterase activity by mixtures of organophosphate and carbamate insecticides. Environ Toxicol Chem 25:1200–1207
- Deneer JW (2000) Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. Pest Manag Sci 56:516–520
- 261. Laetz CA, Baldwin DH, Collier TK, Hebert V, Stark JD, Scholz NL (2009) The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. Environ Health Perspect 117:348

- Pape-Lindstrom PA, Lydy MJ (1997) Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. Environ Toxicol Chem 16:2415–2420
- Harbers JV, Huijbregts MAJ, Posthuma L, Van de Meent D (2006) Estimating the impact of high-production-volume chemicals on remote ecosystems by toxic pressure calculation. Environ Sci Technol 40:1573–1580
- De Zwart D, Posthuma L (2005) Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. Environ Toxicol Chem 24:2665–2676
- 265. Van der Oost, Postma R, Pldzdol J (2016) Ecologische Sleutelfactor Toxiciteit. Deel 1: methode voor het in beeld brengen van de toxiciteit. STOWA Report 2016-15A. http://www.stowa.nl/projecten/ecologisch e_sleutelfactor_8_toxiciteit_ontwikkeling_instrument_voor_ecolo gische_effectanalyse_toxiciteit_
- 266. Barceló D (2007) Effect-directed analysis of key toxicants in european river basins: a review (pp 9). Environ Sci Pollut Res 14:30–38
- 267. Brack W, Schirmer K, Erdinger L, Hollert H (2005) Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-*O*-deethylase inducers in aquatic sediments. Environ Toxicol Chem 24:2445–2458
- Hecker M, Hollert H (2009) Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. Environ Sci Pollut Res Int 16:607–613
- 269. Qu G, Shi J, Wang T, Fu J, Li Z, Wang P et al (2011) Identification of tetrabromobisphenol A diallyl ether as an emerging neurotoxicant in environmental samples by bioassay-directed fractionation and HPLC-APCI-MS/MS. Environ Sci Technol 45:5009–5016
- Bal-Price A, Pistollato F, Sachana M, Bopp SK, Munn S, Worth A (2018) Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. Toxicol Appl Pharmacol. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.008
- Ouyang X, Leonards PEG, Tousova Z, Slobodnik J, de Boer J, Lamoree MH (2016) Rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by effectdirected analysis using LC × LC fractionation, a high throughput in vitro assay, and parallel identification by time of flight mass spectrometry. Anal Chem 88:2353–2360. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b043 11
- 272. Stütz L, Weiss SC, Schulz W, Schwack W, Winzenbacher R (2017) Selective two-dimensional effect-directed analysis with thin-layer chromatography. J Chromatogr A 1524:273–282
- 273. Buenafe OE, Orellana-Paucar A, Maes J, Huang H, Ying X, De Borggraeve W et al (2013) Tanshinone IIA exhibits anticonvulsant activity in zebrafish and mouse seizure models. ACS Chem Neurosci 4:1479–1487
- 274. Di Paolo C, Seiler T-B, Keiter S, Hu M, Muz M, Brack W et al (2015) The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis—a review. Environ Sci Eur 27:8
- 275. Orellana-Paucar AM, Serruys A-SK, Afrikanova T, Maes J, De Borggraeve W, Alen J et al (2012) Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. Epilepsy Behav 24:14–22
- 276. Fabel S, Niessner R, Weller MG (2005) Effect-directed analysis by highperformance liquid chromatography with gas-segmented enzyme inhibition. J Chromatogr A 1099:103–110
- 277. Ingkaninan K, de Best CM, van der Heijden R, Hofte AJP, Karabatak B (2000) High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. J Chromatogr A 872:61–73
- 278. Collins FS, Gray GM, Bucher JR (2008) Toxicology. Transforming environmental health protection. Science 319:906–907
- 279. Epa US (2015) ORD. Toxicity forecasting. https://www.epa.gov/chemi cal-research/toxicity-forecasting
- 280. EBI Web Team (2018) ChEMBL. https://www.ebi.ac.uk/chembl/. Accessed 3 Aug 2018
- 281. The PubChem Project. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. Accessed 3 Aug 2018
- Richard AM, Judson RS, Houck KA, Grulke CM, Volarath P, Thillainadarajah I et al (2016) ToxCast chemical landscape: paving the road to 21st century toxicology. Chem Res Toxicol 29:1225–1251

Page 33 of 34

- Valdivia P, Martin M, LeFew WR, Ross J, Houck KA, Shafer TJ (2014) Multiwell microelectrode array recordings detect neuroactivity of ToxCast compounds. Neurotoxicology 44:204–217
- 284. Frank CL, Brown JP, Wallace K, Mundy WR, Shafer TJ (2017) From the cover: developmental neurotoxicants disrupt activity in cortical networks on microelectrode arrays: results of screening 86 compounds during neural network formation. Toxicol Sci 160:121–135
- Tardiff DF, Jui NT, Khurana V, Tambe MA, Thompson ML, Chung CY et al (2013) Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α-synuclein toxicity in neurons. Science 342:979–983
- Tardiff DF, Lindquist S (2013) Phenotypic screens for compounds that target the cellular pathologies underlying Parkinson's disease. Drug Discov Today Technol 10:e121–e128
- Xi Y, Yu M, Godoy R, Hatch G, Poitras L, Ekker M (2011) Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein in dopaminergic neurons of the ventral diencephalon. Dev Dyn 240:2539–2547
- 288. Parkinson Disease, Secondary-MeSH—NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih. gov/mesh/68010302. Accessed 3 Aug 2018
- Pubchem. PubChem Classification Browser. https://pubchem.ncbi.nlm. nih.gov/classification/. Accessed 3 Aug 2018
- Epa US, ORD (2016) Downloadable Computational Toxicology Data. https://www.epa.gov/chemical-research/downloadable-computatio nal-toxicology-data
- 291. Chemistry Dashboard| Home. https://comptox.epa.gov/dashboard/. Accessed 3 Aug 2018
- 292. Williams AJ, Grulke CM, Edwards J, McEachran AD, Mansouri K, Baker NC et al (2017) The CompTox Chemistry Dashboard: a community data resource for environmental chemistry. J Cheminform 9:61
- 293. Shah I, Liu J, Judson RS, Thomas RS, Patlewicz G (2016) Systematically evaluating read-across prediction and performance using a local validity approach characterized by chemical structure and bioactivity information. Regul Toxicol Pharmacol 79:12–24
- 294. CompTox Dashboard. https://comptox.epa.gov/dashboard. Accessed 3 Aug 2018
- 295. Baker N, Knudsen T, Williams A (2017) Abstract Sifter: a comprehensive front-end system to PubMed. F100Res. https://doi.org/10.12688/f1000 research.12865.1
- Gallampois CMJ, Schymanski EL, Krauss M, Ulrich N, Bataineh M, Brack W (2015) Multicriteria approach to select polyaromatic river mutagen candidates. Environ Sci Technol 49:2959–2968
- Ruttkies C, Schymanski EL, Wolf S, Hollender J, Neumann S (2016) Met-Frag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. J Cheminform. https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9
- 298. MetFrag. https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta/. Accessed 3 Aug 2018
- 299. GNPS. The future of natural products research and mass spectrometry. https://gnps.ucsd.edu/. Accessed 3 Aug 2018
- 300. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y et al (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. Nat Biotechnol 34:828–837
- Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD et al (2010) Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environ Toxicol Chem 29:730–741
- 302. Watanabe KH, Andersen ME, Basu N, Carvan MJ 3rd, Crofton KM, King KA et al (2011) Defining and modeling known adverse outcome pathways: domoic acid and neuronal signaling as a case study. Environ Toxicol Chem 30:9–21
- 303. Aopwiki. https://aopwiki.org. Accessed 3 Aug 2018
- 304. Sachana M, Munn S, Bal-Price A (2016) Adverse outcome pathway on chronic binding of antagonist to *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) during brain development induces impairment of learning and memory abilities. OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/5jlsq s5hcrmq-en
- 305. Sachana M, Munn S, Bal-Price A (2016) Adverse Outcome Pathway on binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain leading to excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment. OECD Series Adverse Outcome Pathways. https://doi.org/10.1787/5jlr8vqgm630-en
- Gong P, Hong H, Perkins EJ (2015) Ionotropic GABA receptor antagonism-induced adverse outcome pathways for potential neurotoxicity biomarkers. Biomark Med 9:1225–1239
- 307. Bal-Price A, Lein PJ, Keil KP, Sethi S, Shafer T, Barenys M et al (2017) Developing and applying the adverse outcome pathway concept for understanding and predicting neurotoxicity. Neurotoxicology 59:240–255
- Paul Friedman K, Watt ED, Hornung MW, Hedge JM, Judson RS, Crofton KM et al (2016) Tiered high-throughput screening approach to identify thyroperoxidase inhibitors within the toxcast phase I and II chemical libraries. Toxicol Sci 151:160–180
- 309. LaLone CA, Villeneuve DL, Wu-Smart J, Milsk RY, Sappington K, Garber KV et al (2017) Weight of evidence evaluation of a network of adverse outcome pathways linking activation of the nicotinic acetylcholine receptor in honey bees to colony death. Sci Total Environ 584–585:751–775
- Russom CL, LaLone CA, Villeneuve DL, Ankley GT (2014) Development of an adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality. Environ Toxicol Chem 33:2157–2169
- 311. Fay KA, Villeneuve DL, LaLone CA, Song Y, Tollefsen KE, Ankley GT (2017) Practical approaches to adverse outcome pathway development and weight-of-evidence evaluation as illustrated by ecotoxicological case studies. Environ Toxicol Chem 36:1429–1449
- Knapen D, Angrish MM, Fortin MC, Katsiadaki I, Leonard M, Margiotta-Casaluci L et al (2018) Adverse outcome pathway networks i: development and applications. Environ Toxicol Chem. https://doi.org/10.1002/ etc.4125
- 313. LaLone CA, Villeneuve DL, Lyons D (2016) ... highlight: sequence alignment to predict across species susceptibility (SeqAPASS): a web-based tool for addressing the challenges of cross-species extrapolation of Toxicological. academic.oup.com. https://academic.oup.com/toxsci/article-abstract/153/2/228/2578709
- Li X, Yu J, Li J, Wu Y, Li B (2017) Dopaminergic dysfunction in mammalian dopamine neurons induced by simazine neurotoxicity. Int J Mol Sci. https://doi.org/10.3390/ijms18112404
- Polinsky RJ (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. Clin Ther 20:634–647
- Küster E, Altenburger R (2007) Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (Danio rerio). Chemosphere 68:751–760
- Clotfelter ED, Bell AM, Levering KR (2004) The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. Anim Behav 68:665–676
- Kirubagaran R, Joy KP (1990) Changes in brain monoamine levels and monoamine oxidase activity in the catfish, Clarias batrachus, during chronic treatments with mercurials. Bull Environ Contam Toxicol 45:88–93
- Weber DN, Connaughton VP, Dellinger JA, Klemer D, Udvadia A, Carvan MJ 3rd (2008) Selenomethionine reduces visual deficits due to developmental methylmercury exposures. Physiol Behav 93:250–260
- 320. Huang TL, Obih PO, Jaiswal R, Hartley WR, Thiyagarajah A (1997) Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (Lepisosteus

Page 34 of 34

oculatus) as biomarkers of effect in the lower Mississippi River Basin. Bull Environ Contam Toxicol 58:688–695

- 321. Murphy CA, Rose KA, Alvarez MC, Fuiman LA (2008) Modeling larval fish behavior: scaling the sublethal effects of methylmercury to population-relevant endpoints. Aquat Toxicol 86:470–484
- 322. Ivan LN, Schmitt BR, Rose KA, Riley SC, Rose JB and Murphy CA (2018) Evaluation of the thiamine dose–response relationship for lake trout (*Salvelinus namaycush*) fry using an individual based model. J Great Lakes Res. https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.08.013
- 323. Mora-Zamorano FX, Klingler R, Basu N, Head J, Murphy CA, Binkowski FP et al (2017) Developmental methylmercury exposure affects swimming behavior and foraging efficiency of yellow perch (*Perca flavescens*) Larvae. ACS Omega 2:4870–4877
- 324. Armstrong BM, Mora-Zomorano FX, Carvan MN, McNaught S, Basu N, Head J, Klingler RK, Ivan LN, Murphy CA (2018) Yellow perch recruitment in Lake Michigan: exploring the impacts of methylmercury induced behavioral alterations. CJFAS, New York
- Alvarez MC, Murphy CA, Rose KA, McCarthy ID, Fuiman LA (2006) Maternal body burdens of methylmercury impair survival skills of offspring in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). Aquat Toxicol 80:329–337
- 326. Mora-Zamorano FX, Klingler R, DeBofsky A, Waltz M, Larson J, Anderson D, Binkowski F, Goetz F, Basu N, Head J, Tonellato P, Murphy CA, Carvan MJ (2018) Gene expression alteration associated with early embryonic methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*) and yellow perch (*Perca flavescens*). Environ Sci Technol 195:301–311
- 327. Murphy CA (2006) Modeling the effects of endocrine disrupting chemicals on Atlantic croaker: understanding biomarkers and predicting population responses. http://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewconten t.cgi?article=1448&context=gradschool_dissertations
- Celander MC, Goldstone JV, Denslow ND, Iguchi T, Kille P, Meyerhoff RD et al (2011) Species extrapolation for the 21st century. Environ Toxicol Chem 30:52–63
- Krewski D, Acosta D Jr, Andersen M, Anderson H, Bailar JC III, Boekelheide K et al (2010) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 13:51–138
- 330. Murphy CA, Garcia-Reyero N, Carvan MJ, Jones, MJ (2015) Development of an adverse outcome pathway for neurodevelopment in larval fish to predict effects of contaminants on survival and growth across multiple ecologically relevant taxa. EPA STAR Grant R835798
- 331. Hass U (2006) The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity. Reprod Toxicol 22:148–156
- 332. Peterson EK, Buchwalter DB, Kerby JL, LeFauve MK, Varian-Ramos CW, Swaddle JP (2017) Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. Curr Zool 63:185–194
- OECD. Users' Handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing Adverse Outcome Pathways. OECD Series on Adverse Outcome Pathways 2018. https://doi.org/10.1787/5jlv1m9d1g 32-en
- 334. Villeneuve DL, Angrish MM, Fortin MC, Katsiadaki I, Leonard M, Margiotta-Casaluci L et al (2018) Adverse outcome pathway networks II: network analytics. Environ Toxicol Chem. https://doi.org/10.1002/ etc.4124

RESEARCH

Open Access



Riccardo Massei^{1*}, Henner Hollert², Martin Krauss¹, Wolf von Tümpling⁴, Cindy Weidauer¹, Peter Haglund³, Eberhard Küster⁵, Christine Gallampois³, Mats Tysklind³ and Werner Brack^{1,2}

Abstract

Background: The toxicological characterization of sediments is an essential task to monitor the quality of aquatic environments. Many hazardous pollutants may accumulate in sediments and pose a risk to the aquatic community. The present study provides an attempt to integrate a diagnostic whole mixture assessment workflow based on a slightly modified *Danio rerio* embryo acute toxicity test with chemical characterization. *Danio rerio* embryos were directly exposed to sieved sediment ($\leq 63 \mu$ m) for 96 h. Sediment samples were collected from three polluted sites (Kramfors, Sundsvall and Örnsköldsvik) in the Gulf of Bothnia (Sweden) which are characterized by a long history of pulp and paper industry impact. Effect data were supported by chemical analyses of 237 organic pollutants and 30 trace elements.

Results: The results show that malformations and neurotoxic compounds are the main drivers of differentiation in chemical and effects analyses, respectively. Specific spinal cord malformations and delayed hatching were observed only in sediments from Kramfors while light hyperactivity was seen only after exposure to sediments from Sundsvall.

Conclusions: Our experiments demonstrate that specific chemical profiles lead to specific effect patterns in *Danio rerio* embryos. In fact, behavioral endpoints could help detect the exposure to neurotoxins, and the observation of body malformations seems to be a potential tool for the identification of site-specific pollutants as polychlorinated biphenyl (PCBs), brominated flame retardants (BFRs) and several pesticides. Overall, results show the suitability of *Danio rerio* embryos for the fast screening of sediment samples.

Keywords: Danio rerio embryos, Sediments, Monitoring, Neurotoxicity, Behavior, Mixtures

Background

Sediments are a well-known sink for a large variety of pollutants that may cause distress to benthic and pelagic species in case of their remobilization to the water-phase [1]. Risk assessment of complex mixtures may involve component-based approaches by applying chemical analysis together with measured or predicted toxicity data





© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

^{*}Correspondence: riccardo.massei@ufz.de

¹ Department of Effect-Directed Analysis, Helmholtz Centre

for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

of environmental samples and were also successfully applied for the characterization of aquatic sediments [11–17]. However, despite the undoubted advantages of cell-based assays for the analysis of toxicological patterns in sediments, in vitro results cannot directly predict the biological responses in more complex organisms and aquatic communities [18]. Moreover, only a minority of MoA covered by in vitro assays are suited to test complex environmental mixtures [19] including important toxic endpoints such as neurotoxicity [20]. Thus, in vitro tools need to be complemented with diagnostic in vivo monitoring. However, accepted and validated workflows for the in vivo toxicological profiling of complex mixtures including sediment contamination are still lacking.

One of the most promising organisms for diagnostic in vivo testing of sediment extracts is zebrafish (Danio rerio) embryos, which are a versatile model suitable for high-throughput analysis while keeping several advantages of in vitro approaches (i.e., low-cost, sensitivity, short duration of the test). The fish embryo toxicity test (FET) with Danio rerio has been considered as a good surrogate for the acute toxicity fish test [21] and was successfully used in several studies for the detection of toxicity and neurotoxicity in sediments samples [9, 22-24]. One of the major advantages of the FET with Danio rerio is the possibility to monitor several toxic endpoints including the modification of molecular processes and malformations which can be related to the exposure to specific pollutants [25–28]. Further, the FET with Danio rerio offers the possibility to monitor changes in behavioral patterns (i.e., swimming activity, early spontaneous movements), which may be relevant also for the population level [29, 30].

The present study provides a first attempt to integrate a diagnostic whole mixture assessment workflow based on in vivo toxicological profiling of *Danio rerio* after exposure to sediments for 4 days with a component-based approach applying chemical analysis of a wide target list of organic and inorganic chemicals. The objectives of the present study were (1) to validate this approach with sediments collected from the coast of Gulf of Bothnia (GoB, Baltic Sea, Sweden) (2) to identify effect patterns with multi-endpoint diagnosis in zebrafish embryos and support them with chemical analyses and (3) to offer a first in vivo ecotoxicological profile of sediment samples.

Methods

Sampling and sample preparation

Sediments were collected in GoB in an extensive sampling campaign in 2013 as part of the Swedish research project REACT. Three sites were selected in the bays of the city of Kramfors, Örnsköldsvik and Sundsvall, Sweden. With a grab sampler, samples from the top layers of the sediments with 5-10 cm thickness were taken. The three sites have a long history of pulp and paper industry, saw mills, as well as other industrial activities with possibly elevated levels of a series of legacy contaminants in the sediments, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyl (PCBs), organochlorine insecticides (OCPs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and metals. The three sites are also characterized by the input of waste water treatment plants (WWTPs) and, thus, may receive additional micropollutants. After sampling, the samples were stored in triplicate in plastic containers, transported to the laboratory on ice and stored at -20 °C until freeze-drying. The freeze-dried sediments were sieved to 63 µm and stored in brown glass bottles at -20 °C until further treatment. Details about sampling sites, total organic carbon, total inorganic carbon and black carbon are provided in Additional file 1: Table S1.

Sediment extraction for chemical analyses

For LC- and GC-HRMS analyses for organic compounds, samples were extracted according to Massei et al. [31] with slight modifications. Extraction and analysis were based on the amount of total organic carbon (TOC) rather than on dry weight assuming TOC as the predominant phase for the accumulation of chemicals and to keep matrix effects in MS on a similar level. Further details of the pressurized liquid extraction (PLE) method and the preparation of the normal phase (NP) for clean-up are given in Additional file 1: S1.

For trace element analysis the sequential extraction procedure followed the three-steps sequential extraction of Rauret et al. [32]. Blanks and certified reference material (CRM) BCR-701 were used at every step of the extraction process to evaluate the instrumental method and for calibration. The element recovery rates from the CRM in each extraction solution were between 85 and 112% and similar to values published by Margui et al. [33] and Tokalioğlu and Kartal [34]. All samples were finally digested in aqua regia as follows. Aliquots of 250 mg of sample material were funneled into quartz microwave vessel with aqua regia (6 mL HCl; 37%, 2 mL HNO₃; 65%) in a pressure- and temperature-controlled microwave. The elements in the soil extracts and digests were determined by inductively coupled plasma MS (ICP-MS/MS; Agilent 8800, Agilent Technologies, Germany) according to the norm for application of inductively coupled plasma MS (ICP-MS) EN ISO 17294-2:2017-01 [35].

Targeted chemical analysis of organic and inorganic pollutants

A list of 237 organic compounds likely to occur in sediments [i.e., pesticides, industrial chemicals, steroids, persistent organic pollutants (POPs)] and 30 trace elements including the main heavy metals were selected for chemical analysis covering a wide range of physicochemical properties. Details on equipment, target compounds list, LC, GC, and MS conditions, quantification, method detection limits (MDLs), and internal standards are provided in Additional file 1: S2–S4, Tables S2–S6, S9; Additional file 2: Tables S7, S8. Additional methodological details on target chemical analyses are described in Massei et al. [31].

Fish culture, fish embryo production and selection

Adult zebrafish of the strain UFZ-OBI had been originally established from a wild type strain purchased from a local supplier (OBI hardware store, Leipzig) and had been bred at the UFZ for more than 13 generations. Fish were kept in 14-L aquaria with 25-30 fish each with a sex distribution between female to male of 1:2. The light-dark rhythm was 14:10 h and the water temperature was 26 ± 1 °C. Water parameters were measured frequently (pH 7-8; water hardness 2-3 mmol/L, conductivity 540–560 μ S/cm, nitrate < 2.5 mg/L, nitrite < 0.025 mg/L, ammonia < 0.6 mg/L, oxygen saturation 87–91%). Within 30 min after spawning, eggs were collected using a grid covered dish and successively cleaned with aerated ISO standard dilution water (ISO-water) as specified in ISO 7346-3. Developmental stages were identified according to Kimmel (1995). The fish embryo acute toxicity test was conducted as described in the OECD TG 236 and in Bittner et al. [36], but additional endpoints were included.

Danio rerio multi-endpoints toxicity assay with sediments contact test

Twenty fertilized eggs were directly exposed to the freeze-dried sediments fine fraction ($\leq 63 \mu$ m) in 40 mL of ISO-water (1 embryo/2 mL ISO-water) for 105 h at a temperature of 26 ± 1 °C and a photoperiod 12:12 light/dark according to the sediment contact protocol by Hollert et al. [22] with few modifications. Sediments were completely covering the bottom of the crystallization dish (total amount between 0.25 and 0.5 g) and agitated with 55 rpm. Negative control consisted in pure ISO-Water without adding inert particle or blank quartz powder. Table 1 gives an overview on the toxicological endpoints registered during exposure. Endpoints were selected according to their toxicological

relevance, and their characterization in previous studies [37].

At 48-h post-fertilization (hpf) the heart is formed in two chambers and it is possible to count a regular heartbeat. The heartbeat rate was assessed by direct observation of the heart of the 5 randomly chosen embryos for 10 s. Heartbeat was counted manually and measurement time did not exceed 2 min to avoid temperature drops. From 72 hpf the hatching rate becomes stable for most of the larvae. The numbers of hatched embryos were counted at 24, 48, 72, and 96 hpf. An embryo was considered hatched when its body completely left the chorion. After 96-h embryos were selected for further locomotor activity (LA) determination [38]. For the evaluation of LA, 16 embryos for each sample and negative control were transferred to a 96 wheel plate with rectangular angles (one embryo per wheel, with 500 µL of clean ISO water). A randomized plate set-up was used to avoid interference in behavioral analyses. LA was only assessed for samples with mortality below 50% and a hatching rate above 50%. LA was registered over 50 min at a light/dark regime of 10-min dark, 20-min light and 20-min dark. Embryonic movement was tracked using the ZebraBox video tracking system (Viewpoint, Lyon, France) at a temperature of 28 ± 1 °C. Prior to the measurements, embryos were acclimated in the device for at least 10 min.

After LA evaluation, embryos were pooled together and used for acetylcholinesterase (AChE) analysis according to Küster [39]. Mortality and sublethal effects (i.e., yolk and pericardial edema, body deformations) were registered every 24 h and dead embryos were removed from the exposure media. The test media was not renewed during exposure.

One negative (ISO-Water) and one positive control (3,4-dichloroaniline, 3.4 mg/L) were tested in each experiment. The experiments were conducted in three independent replicates (n = 3). No fungal or bio-film growth was observed during or at the end of the exposure.

FET quality control

At the end of exposure, mortality of the negative control did not exceed 10%. Mortality of positive controls was in the expected toxicity range (between 30 and 80%). Oxygen concentration and pH were above the limits described by Andrade et al. [40] for developmental retardation and other sublethal effects (dissolved oxygen ≥ 6 mg/L; pH between 6 and 8). Thus, observed effects have to be considered effects of the exposure to sediment-bound chemicals and no other physical stressors.

Endpoints	Observation stage (hpf)	Type of toxicity	References	Active compounds
Modulation of heart rate	48	Cardiotoxicity: Decrease (bradycardia) or increase (tachycardia) of the heartrate. Blocks of the β-adrenergic receptor, mainly on the myocardium	Carlsson et al. [73] Fraysse, Mons and Garric [25]	Mainly β-blockers (i.e., propranolol, metoprolol), PPCPs, several insecticides
Delayed hatching	From 72 to 96	Inhibition of high choriolytic enzymes and physical movement of the embryo	Jin et al. [74] De Gaspar et al. [75]	Several inorganic and organic pollutants
Inhibition of locomotor activity	96	Neurotoxicity: decrease or increase of the swim- ming distance and dark/light stimulation	Irons et al. [76] Selderslaghs et al. [77]	Several neuroactive pollutants
Inhibition of AChE activity	105	Neurotoxicity: inhibition of the acetylcholister- ase and increase of the duration of action of neurotransmitter acetylcholine	Küster [39] Strmac et al. [78] Kais Stengel, Batel and Braunbeck [9]	Organophosphates and carbamates insecticides, organophosphates flame retardants (OPFR), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)
Sublethal and mortality effects	From 24 to 105	Embryotoxicity and teratogenicity	Scholz et al. [79]	Several inorganic and organic pollutants

Data treatment, multivariate, and statistical analysis

Multivariate statistical analyses and k-clustering were performed to group sites according to their chemical pattern. Data were log transformed, centered and normalized to avoid misclassification due to the differences in data dimensionality [41]. For *k*-means clustering, the Euclidean distance between sites was used to evaluate similarity and the Ward's method was used in the linkage between sites and chemical patterns [41]. Statistical difference between control and treatments for lethality, heartbeat, hatching, and AchE inhibition were detected using a Tuckey multiple pairwise-comparisons test. For behavioral analysis, statistical differences between treatments and controls were detected by a non-parametric Kruskal-Wallis test with post-Bonferroni correction. All statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2010[®], Sigma Plot[®] (version 12.0.0.182), the software RStudio[®] (version 1.0.136) and the R packages drc, MASS, FactoMineR, factoextra, FitAR, chemometrics,ggplot2, dplyr, ggpubr, magrittr, and car.

Results

Occurrence and patterns of organic and inorganic pollutants

Organic pollutants

Out of the 237 selected target compounds analyzed (Additional file 2: Table S8), 71 compounds (27 PAHs, 10 PCBs, 14 pesticides and biocides (PEST), 7 compounds from industrial origin, 7 brominated flame retardants (BFR) and other brominated compounds (BC), and 6 more compounds from various groups were detected.

Among the three sites, the area of Kramfors showed the highest loads of chemicals with 53 identified compounds and a cumulative concentration of 3.6 μ g/mg TOC. Native sediments from Örnsköldsvik and Sundsvall showed lower cumulative concentration with 160 and 163 ng/mg TOC, respectively.

The site of Kramfors showed higher cumulative concentrations of PAHs ($3.3 \mu g/mg$) with the 3- and 4-ringed phenanthrene and fluoranthene detected at concentrations of 830 and 535 ng/mg TOC. The sites of Sundsvall and Örnsköldsvik showed cumulative concentrations of PAHs of 133 and 146 ng/mg TOC, respectively. Additionally, BFRs were detected only in Kramfors with concentrations ranging from 0.02 to 1.1 ng/mg TOC.

The two fungicides irgarol and fenpropimorph (20 and 6 ng/g TOC), the herbicide chloridazon (0.03 ng/ mg TOC) and the insecticide cyhalothrin (1.1 ng/mg TOC) were detected only in the area of Örnsköldsvik and not at other two sites of the GoB. Moreover, we identified in Örnsköldsvik the two herbicide transformations

products, 2-hydroxyatrazine and 2-hydroxy-terbuthylazine- (both 0.1 ng/mg TOC).

Concentrations of organic pollutants for each site and compound are provided in Additional file 2: Table S10.

Trace elements

Overall, native sediments from the three sites of GoB showed similar total metal concentrations [from 50 up to 57 g/kg dry weight (d.w.)]. In particular, the pseudo total concentrations (aqua regia digested) of the seven priority elements proposed by the Swedish EPA monitoring list [42] (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) ranged from 0.33 to 165 mg/kg d.w. The metal concentrations (Additional file 2: Table S10) in the three fractions with different degrees of bioavailability F1 (weekly associated to carbonates, considered as readily bioavailable), F2 (reducible fraction and potentially bioavailable after perturbation) and F3 (bound to humic substances and sulfides and not bioavailable) are shown and discussed in Additional file 1: S5.

It may be summarized that metal concentrations at all three sites of GoBs were similar to background values at the river Elbe [43] as well as with the standard from Turekian and Wedepohl [44]. Total priority element concentrations detected in our study were in average 22 times lower than the one reported for contaminated surface sediments from Oskarshamn harbor (Sweden) [45] and are thus considered as unlikely to drive toxic effects.

K-means clustering of organic chemicals sediment contamination highlighted the presence of ubiquitous and site-specific pollutants (Fig. 1). We identified one cluster with compounds that are ubiquitous in all the sites of GoB (green cluster, UBI).

The green cluster contains 23 PAHs and six additional compounds (2,6-diisopropylnaphthalene, diocdiphenyl sulfone, tyldiphenylamine, m-Terphenyl, hexachlorobenzene and alpha-tocopherol acetate). A second cluster (red cluster, KR) is composed by compounds that were detected mostly in the area of Kramfors. The site was characterized by 5 BCs, 3-bromocarbazole, the two PCBs 118 and 52, the PAH indeno (1,2,3cd)fluoranthene and three sulfonated compounds. A third cluster (green cluster, SU&OR) contains chemicals which characterized the sites Sundsvall and Örnsköldsvik. The green cluster was characterized by the insecticide DDT and its metabolites, 8 PCBs congeners, 4 fungicides (carbendazim, fenpropimorph, irgarol and chloridazon), the biocide triclocarban, the transformation products of atrazine (2-hydroxyatrazine) and terbuthylazine (2-hydroxy-terbuthylazine), the PAHs 1-phenylnaphthalene, 9-vinylanthracene, cis-stilbene, o-terphenyl, hexachlorobenzene, and the pyrethroid cyhalothrin.



No specific contamination patterns were highlighted for inorganic chemicals by *k*-means cluster analyses due to similar trace element concentrations in the background range among the three sites (data not shown).

Sediments toxicological profiling with *Danio rerio* embryos *Lethal and sublethal effects*

After 96 h, all tested sediments showed low lethality comparable to negative control (10%), see Fig. 2a.

In all of the tested samples the embryos showed clear developmental retardation or yolk/pericardial edemas. All embryos exposed to sediments from Kramfors exhibited bent spines (Additional file 1: Fig. S3) and slow movements with twitching spasms. Embryos exposed to sediments from Sundsvall did not show clear sublethal effects while embryos exposed to sediments from Örnsköldsvik occasionally exhibited side swimming and slightly slower movements as compared to the control.

Heartbeat

After 48 h, native sediments from all sites caused a decrease of the embryos heart beat (average decrease 39%). The inhibition of the heartbeat was particularly strong in embryos exposed to sediments from Kramfors (47%). All three sites were statically different from the control ($p \le 0.01$). Results are shown in Fig. 2b.

Hatching rate

Embryos exposed to sediments from Örnsköldsvik and Sundsvall showed a hatching rate similar to the negative control. Embryos exposed to Kramfors had lower hatching rates at 48 (no hatching) and 72 (decrease of 84%) hours compared to those exposed to sediments from the other sites ($p \le 0.01$). After 96 h of exposure, the hatching rate of all exposed embryos was comparable in all samples. Results are shown in Fig. 2c.



LA

Negative controls showed low swimming activity during both light phases. However, the first 10 min of the dark phase were characterized by a peak of activity followed by a steady decrease of total LA in the next 10 min. This trend was already observed by other authors in previous studies [46–48].Considering this trend, we analyzed the movement of fish embryos at four different phases: first light phase (L1), first 10 min of the dark phase (D1), second 10 min of the dark phase (D2) and second light phase (L2).

Embryos exposed to native sediments from GoB caused a general increase of the movement during L2. The increase was particularly strong for native sediments for Kramfors (3.1, $p \le 0.001$) and Sundsvall (3.7, $p \le 0.001$). Embryos exposed to native sediments from Sundsvall exhibited a general average increase of movement during D2 (2.6 times, $p \le 0.001$). Moreover, sediments from Sundsvall caused an increase of movements during L1 (2.4, $p \le 0.001$). Embryos exposed to sediments from Kramfors showed stronger inhibition of the movement (0.3 times, $p \le 0.001$) during D1 and increase during L1 (2.7, $p \le 0.001$). Lastly, native sediments from Örnsköldsvik exhibit values that are comparable with the controls and a slightly higher activity during D1 (1.4, $p \le 0.001$) and D2 (2.3, $p \le 0.001$). Results are shown in Fig. 3.

Inhibition of AChE

At 105 h, there was no statistical significance difference in the AChE activity in *Danio rerio* embryos exposed to native sediments from GoB and negative controls (Additional file 1: Figure S1).

An overview on the toxicological patterns in sediments from the three sites is given in Table 2.

Discussion

The major goal of this study was to validate a multiendpoints in vivo assay to perform a fast identification of toxicological patterns in aquatic sediments. In this context, our results confirmed that different chemical mixtures lead to specific effects patterns in *Danio rerio* embryos. In particular, we found that the chemical mixture at site Kramfors mainly resulted in developmental malformation, while the ones detected in Sundsvall and



Table 2 Toxicological pattern observed *Danio rerio* embryos after 96-h exposure to surface sediments from Gulf of Bothnia (fraction \leq 63 µm)

Endpoints	Kramfors	Örnsköldsvik	Sundsvall
Lethality	Comparable with control	Comparable with control	Comparable with control
Body malformations	Bended spine	Comparable with control	Comparable with control
Heartbeat	Decrease ($p \le 0.01$)	Decrease ($p \le 0.01$)	Decrease ($p \le 0.01$)
Movements increase	L1 (2.7-fold increase) and L2 (3.1-fold increase)	D1, 2 and L2 (1.4-, 2.3-, and 1.8-fold increase)	L1, D2, and L2 (2.4-, 2.6- and 3.7-fold increase)
Movements decrease	D1 (0.4-fold decrease)	Comparable with control	Comparable with control
AChE inhibition	Comparable with control	Comparable with control	Comparable with control
Hatching	Retarded at 72 hpf ($p \le 0.01$)	Comparable with control	Comparable with control

Örnsköldsvik acted primarily on the swimming activity (Table 2).

Overall, the selected endpoints offered a comprehensive toxicological characterization of complex environmental mixtures. In particular, developmental malformations and delay in hatching were valid endpoints for the characterization of sediment pollution. In fact, abnormal spinal curvatures (i.e., kyphosis) and hatching problems were observed only in embryos exposed to sediments from Kramfors. However, it is important to underline that several chemicals that were detected in the three sites of GoB (i.e., PAHs, BDEs, heavy metals) were reported to cause spinal curvatures, general developmental toxicity, degeneration of myocytes, neural cell death and delayed hatching [45–55]. Thus, it may be hypothesized that the higher concentrations of PAHs in Kramfors (24-fold higher compared to those measured in Sundsvall and Örnsköldsvik) may actually be responsible of the observed effect. In fact, it has been shown that teratogenic effects in early fish life stages are mainly caused by high PAHs concentrations [26, 56].

In this case, effect-directed analysis (EDA) or toxicity identification evaluation (TIE) could help to reduce complexity of the environmental mixture and allow for the identification of specific causative chemicals [57]. Moreover, additional non-destructive morphological endpoints (i.e., craniofacial, eyes malformations, tail and somite malformations) may be included in future studies to increase the screening power and specificity of the present workflow. As an example, innovative vertebrate automated screening technology (VAST) may be used to obtain high-content automatic imaging of *Danio reri*o embryos phenotypes [58].

Our workflow with *Danio rerio* embryos confirmed also the possibility to obtain a comprehensive neurotoxicological profile of environmental samples. As recently discussed by Legradi et al. [59] in a recent review, the identification of neuroactive chemicals in the environmental is an important emerging issue. In fact, more than 30,000 commercially used chemicals may have a neurotoxic potential and they could induce changes in the organism behavior leading to severe effects on the ecosystem [59].

In our study, sediments from Kramfors caused an inhibition of the movement during the dark phase, while sediments from Örnsköldsvik and Sundsvall induced an increase of the movement during the dark phases.

The higher swimming activity observed when the embryos were exposed to sediment extracts from Kramfors was probably influenced by spine malformations, occurring as visual impairments in the embryos. In fact, problems with the development of the retinal cells may lead to increased sensitivity to light and impaired behaviors [60]. In this case, the high concentrations of PAHs in Kramfors may also cause developmental defects of the retina, by up-regulating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [61]. Previous findings that environmental concentrations of phenanthrene caused the reduction of cell proliferation in the retina of zebrafish [61] support this hypothesis. It is also possible that the increase of activity during light phase may be related to a specific effect on the nervous system of the embryos. The hypothesis is confirmed by the similar chemical profiles of Örnsköldsvik and Sundsvall (Fig. 1), despite showing a slightly different effect patterns on the swimming behavior during the dark phase. As shown in previous studies, behavioral patterns were suggested to be a sensitive measure of ecotoxicological effects since they respond earlier than other endpoints [62]. Moreover, changes in behavior can be often linked to alteration at higher levels of biological organization [62]. Behavioral patterns were shown to be a robust, sensitive and reliable tool that can be used as early indicator of stress, and thus were used also to understand the effect at population and ecosystem level [29, 30]. Behavioral endpoints were also successfully applied for the identification of toxicity of several compound classes with neurotoxic MoA, including pesticides mixtures, pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), metals and classical POPs [63–66]. However, it may be expected that neurotoxic effects are not restricted to these chemicals, but may be exhibited by many more. Thus, it will be hardly possible to identify individual drivers of neurotoxicity using effects on behavioral endpoints. In fact, many lipophilic neurotoxins accumulating in sediments primarily target membrane sodium channels and cause excitability of the nerves and muscles [67, 68]. Moreover, several anti-inflammatory drugs (steroidal glucocorticoids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, phosphodiesterase inhibitors), and dopaminergic antagonists may increase the waking activity during the light period [69]. However, the alteration of behavior may not only be related to the presence of neuroactive compounds. Since the development of the nervous system is influenced by several upstream molecular events (i.e., cellular replication, migration, differentiation, synaptogenesis), xenobiotics may influence processes that are not directly related to functional impairment, but interference with neurodevelopment [70]. Accordingly, potential effects on cardiac and muscle development could affect behavior as well [70]. The detection of these developmental effects would require appropriate detailed microscopical observations and markers that have not been considered in our screening.

Finally, our results highlight the fact that the heart beat rate may be considered a good marker of general stress, but not a good endpoint for the identification of specific toxicological patterns. It was shown that several PAHs (phenanthrene, naphthalene and benzo(k)fluoranthene) may induce a general bradycardia in zebrafish embryos and defects in the heart structure [71, 72], but also heavy metals for example may exhibit cardiovascular disturbance as heart underdevelopment and, in extreme cases, absence of cardiac muscles [53].

Conclusions

The present study highlights the added value of in vivo toxicological profiling with multi-endpoint FET with a specific focus on sublethal effects and neurotoxicity. This approach may integrate behavioral effects and malformations to discriminate toxic environmental mixtures (here sediment extracts) based on the symptoms they cause. Parallel chemical analysis may provide some insight into possible drivers. However, it is necessary to develop new methods and approaches to better link the observed effect to chemical drivers. The required efforts include testing of a broader range of chemicals and mixtures in multi-endpoints FET together with mechanistic research to better understand the development of the symptoms. An increasing number of mechanistically linked endpoints are needed including specific phenotypic endpoints and modified gene expression to target specific toxicity pathways. EDA and TIE studies may help unravel drivers of toxicity in environmental mixtures.

Additional files

Additional file 1: S1. Sediments extraction and clean-up. S2. GC-HRMS and LC-HRMS methods. S3. Trace Finder parameters. S4. Method detection limits. S5. Trace elements analyses. Table S1. Sediments characteristics and sampling spot information. Table S2. GC oven program. Table S3. Injection details for pulsed split less injection for GC-analysis. Table S4. Parameters of the GC-QExactive HRMS method. Table S5. LC gradient program. Table S6. Settings of the Trace Finder software. Table S9. Chemicals and Equipment. Figure S1. Sampling spot map. Figure S2. Acetylcholisterase inhibition in Danio rerio embryos exposed to sediments of Gulf of Bothnia. Figure S3. Zebrafish embryos after 96 hpf exposed to sediments of Kramfors and Örnsköldsvik.

Additional file 2: Table S7. Method detection limits (MDLs) for the detected compounds in sediment samples. Table S8. Target compounds list, their log D values at pH 7 and the internal standard used for quantification. Table S10. Concentrations of detected compounds in sediments of Gulf of Bothnia.

Abbreviations

AChE: acetylcholisterase; BFR: brominated flame retardants; BR: brominated compounds; CRM: certified reference material; EDA: effect-directed analysis; FET: fish embryo test; GC: gas chromatography; GoB: Gulf of Bothnia; Hpf: hours post-fertilization; HR: high resolution; ICP: inductively coupled plasma; LC: liquid chromatography; MDLs: method detection limits; MoA: mode of action; MS: mass spectrometer; NP: normal phase; OCPs: organochlorine insecticides; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorinated dibenzofurans; PCDDs: polychlorinated dibenzofurans; PEST: pesticides and biocides; PLE: pressurized liquid extraction; POPs: persistent organic pollutants; PPCPs: pharmaceuticals and personal

care products; TIE: toxicity identification evaluation; TOC: total organic carbon; VAST: vertebrate automated screening technology; WWTPs: waste water treatment plants.

Authors' contributions

RM performed all experiments and been has involved in the whole process of analysis and interpretation of the data. HH has been involved in critically revising the FET section. MK contributed to the analysis and interpretation of the LC-HRMS data. WV contributed to the analysis and interpretation of the trace elements data. CW has been involved in the acquisition and analysis of GC-HRMS data. PH, CG and MT have been critically involved in revising the whole chemical analyses and sampling sections. They also gave an important contribution to the characterization of the FET data in revising the FET section. WB made substantial contributions to the whole conception, design and interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Effect-Directed Analysis, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany. ² Department of Ecosystem Analysis (ESA), Institute for Environmental Research, RWTH-Aachen University, Worringer Weg 1, 52074 Aachen, Germany. ³ Department of Chemistry, Umea University, S-901 87 Umeå, Sweden. ⁴ Central Laboratory for Water Analytics and Chemometrics, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Brückstraße 3a, 39114 Magdeburg, Germany. ⁵ Department Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research -UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany.

Acknowledgements

We thank Umeå Marine Science Center, Umeå University, for performing the sampling campaigns organized. We thank also Nicole Schweiger and Margit Petre for the lab technical support. Chemaxon (Budapest, Hungary) is gratefully acknowledged for a free academic license of Marvin and JChem for Excel.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its additional information files.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

We acknowledge funding by the SOLUTIONS Project supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7-ENV-2013-two-stage Collaborative project) under grant no. 603437, the BmBF financed the NeuroBox project under the grant 02WRS1419E and 02WRS1419C) and the REACT research project funded by FORMAS (contract 2012-2090).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 24 October 2018 Accepted: 14 January 2019 Published online: 04 February 2019

References

- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, von Gunten U, Wehrli B (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. Science 313(5790):1072–1077
- Brack W, Escher BI, Müller E, Schmitt-Jansen M, Schulze T, Slobodnik J, Hollert H (2018) Towards a holistic and solution-oriented monitoring

of chemical status of European water bodies: how to support the EU strategy for a non-toxic environment? Environ Sci Eur 30(1):33

- Warren SH, Claxton LD, Diliberto J, Hughes TJ, Swank A, Kusnierz DH, Marshall V, DeMarini DM (2015) Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and drinking water from the Penobscot Indian Nation. Chemosphere 120:690–696
- Floehr T, Scholz-Starke B, Xiao H, Koch J, Wu L, Hou J, Wolf A, Bergmann A, Bluhm K, Yuan X (2015) Yangtze Three Gorges Reservoir, China: a holistic assessment of organic pollution, mutagenic effects of sediments and genotoxic impacts on fish. J Environ Sci 38:63–82
- Garcia ALH, Matzenbacher CA, Santos MS, Prado L, Picada JN, Premoli SM, Corrêa DS, Niekraszewicz L, Dias JF, Grivicich I (2017) Genotoxicity induced by water and sediment samples from a river under the influence of brewery effluent. Chemosphere 169:239–248
- Fetter E, Krauss M, Brion F, Kah O, Scholz S, Brack W (2014) Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos. Aquat Toxicol 154:221–229
- Ke X, Wang C, Zhang H, Zhang Y, Gui S (2015) Characterization of estrogenic receptor agonists and evaluation of estrogenic activity in the sediments of Liaohe River protected areas. Mar Pollut Bull 100(1):176–181
- Maranho L, Baena-Nogueras R, Lara-Martín P, DelValls T, Martín-Díaz M (2014) Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete Hediste diversicolor as bioindicator species. Environ Res 134:353–365
- Kais B, Stengel D, Batel A, Braunbeck T (2015) Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. Environ Sci Pollut Res 22(21):16329–16339
- Wernersson A-S, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, Sanchez W, Dulio V, Broeg K, Reifferscheid G, Buchinger S, Maas H, Van Der Grinten E, O'Toole S, Ausili A, Manfra L, Marziali L, Polesello S, Lacchetti I, Mancini L, Lilja K, Linderoth M, Lundeberg T, Fjällborg B, Porsbring T, Larsson DJ, Bengtsson-Palme J, Förlin L, Kienle C, Kunz P, Vermeirssen E, Werner I, Robinson CD, Lyons B, Katsiadaki I, Whalley C, den Haan K, Messiaen M, Clayton H, Lettieri T, Carvalho RN, Gawlik BM, Hollert H, Di Paolo C, Brack W, Kammann U, Kase R (2015) The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. Environ Sci Eur 27(1):7
- 11. Vethaak AD, Hamers T, Martínez-Gómez C, Kamstra JH, de Weert J, Leonards PE, Smedes F (2017) Toxicity profiling of marine surface sediments: a case study using rapid screening bioassays of exhaustive total extracts, elutriates and passive sampler extracts. Mar Environ Res 124:81–91
- Nam S-H, Shin Y-J, Lee W-M, Kim SW, Kwak JI, Yoon S-J, An Y-J (2015) Conducting a battery of bioassays for gold nanoparticles to derive guideline value for the protection of aquatic ecosystems. Nanotoxicology 9(3):326–335
- de Paiva Magalhães D, da Costa Marques MR, Baptista DF, Buss DF (2014) Selecting a sensitive battery of bioassays to detect toxic effects of metals in effluents. Ecotoxicol Environ Saf 110:73–81
- Khan MI, Cheema SA, Tang X, Hashmi MZ, Shen C, Park J, Chen Y (2013) A battery of bioassays for the evaluation of phenanthrene biotoxicity in soil. Arch Environ Contam Toxicol 65(1):47–55
- 15. Neale PA, Altenburger R, Aït-Aïssa S, Brion F, Busch W, de Aragão Umbuzeiro G, Denison MS, Du Pasquier D, Hilscherová K, Hollert H, Morales DA, Novák J, Schlichting R, Seiler T-B, Serra H, Shao Y, Tindall AJ, Tollefsen KE, Williams TD, Escher BI (2017) Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. Water Res 123:734–750
- 16. Di Paolo C, Ottermanns R, Keiter S, Ait-Aissa S, Bluhm K, Brack W, Breitholtz M, Buchinger S, Carere M, Chalon C, Cousin X, Dulio V, Escher BI, Hamers T, Hilscherová K, Jarque S, Jonas A, Maillot-Marechal E, Marneffe Y, Nguyen MT, Pandard P, Schifferli A, Schulze T, Seidensticker S, Seiler T-B, Tang J, van der Oost R, Vermeirssen E, Zounková R, Zwart N, Hollert H (2016) Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts—towards the implementation of bioanalytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. Water Res 104:473–484
- 17. Välitalo P, Massei R, Heiskanena I, Behnische P, Brack W, Tindallf AJ, Pasquiere DD, Küster E, Mikola A, Schulze T, Sillanpää M (2017) Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. Water Res 126:153–163

- Tice RR, Austin CP, Kavlock RJ, Bucher JR (2013) Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. Environ Health Perspect 121(7):756
- 19. Hayers AW, Thomas JA, Gardner DE (1999) Neurotoxicology—Second Edition. Taylor & Francis, New York
- Busch W, Schmidt S, K
 ühne R, Schulze T, Krauss M, Altenburger R (2016) Micropollutants in European rivers: a mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. Environ Toxicol Chem 35(8):1887–1899
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 149(2):196–209
- 22. Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. J Soils Sediments 3(3):197
- Kammann U, Biselli S, Huhnerfuss H, Reineke N, Theobald N, Vobach M, Wosniok W (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environ Pollut 132(2):279–287
- Keiter S, Peddinghaus S, Feiler U, Goltz B, Hafner C, Ho NY, Rastegar S, Otte JC, Ottermanns R, Reifferscheid G, Strähle U, Braunbeck T, Hammers-Wirtz M, Hollert H (2010) 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 Sediments 10(4):714–717
- 25. Fraysse B, Mons R, Garric J (2006) Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. Ecotoxicol Environ Saf 63(2):253–267
- 26. Schiwy S, Bräunig J, Alert H, Hollert H, Keiter SH (2015) 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 22(21):16305–16318
- 27. Di Paolo C, Seiler TB, Keiter S, Hu M, Muz M, Brack W, Hollert H (2015) The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis—a review. Environ Sci Eur 27(1):8
- Gonzalez ST, Remick D, Creton R, Colwill RM (2016) Effects of embryonic exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on anxiety-related behaviors in larval zebrafish. NeuroToxicology 53:93–101
- 29. Hellou J (2011) Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. Environ Sci Pollut Res 18(1):1–11
- Reinert KH, Giddings JM, Judd L (2002) Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. Environ Toxicol Chem 21(9):1977–1992
- Massei R, Byers H, Beckers LM, Prothmann J, Brack W, Schulze T, Krauss M (2018) A sediment extraction and cleanup method for wide-scope multitarget screening by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 410(1):177–188
- Rauret G, Lopez-Sanchez J, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller P (1999) Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. J Environ Monit 1(1):57–61
- Margui E, Salvadó V, Queralt I, Hidalgo M (2004) Comparison of three-stage sequential extraction and toxicity characteristic leaching tests to evaluate metal mobility in mining wastes. Anal Chim Acta 524(1–2):151–159
- Tokalıoğlu Ş, Kartal Ş (2006) Statistical evaluation of the bioavailability of heavy metals from contaminated soils to vegetables. Bull Environ Contam Toxicol 76(2):311–319
- 17294-2:2017-01, I., Water quality—application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)—Part 2: determination of selected elements including uranium isotopes (ISO 17294-2:2016). 2017
- 36. Bittner L, Teixido E, Seiwert B, Escher Bl, Klüver N (2018) Influence of pH on the uptake and toxicity of β -blockers in embryos of zebrafish, Danio rerio. Aquatic Toxicology 201:129–137
- 37. Hollert H, Keiter SH (2015) Danio rerio as a model in aquatic toxicology and sediment research. Environ Sci Pollut Res 22(21):16243–16246
- Selderslaghs IW, Hooyberghs J, De Coen W, Witters HE (2010) Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol 32(4):460–471

- Küster E (2005) Cholin-and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. Aquat Toxicol 75(1):76–85
- Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Soares AMVM, Scholz S, Domingues I (2017) Zebrafish embryo tolerance to environmental stress factors—concentration–dose response analysis of oxygen limitation, pH, and UV-light irradiation. Environ Toxicol Chem 36(3):682–690
- Palma P, Ledo L, Soares S, Barbosa I, Alvarenga P (2014) Spatial and temporal variability of the water and sediments quality in the Alqueva reservoir (Guadiana Basin; southern Portugal). Sci Total Environ 470:780–790
- 42. Epa S (2000) Environmental quality criteria: coasts and seas. Swedish Environ Protect Agency Rep 5052:138
- Prange A, Bössow E, Erbslöh B, Jablonski R, Jantzen E, Krause P, Krüger F, Leonhard P, Niedergesäß R, Pepelnik R (1997) Geogene Hintergrundwerte und zeitliche Belastungsentwicklung. Abschlussbericht, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH 3:3
- 44. Turekian KK, Wedepohl KH (1961) Distribution of the elements in some major units of the earth's crust. Geol Soc Am Bull 72(2):175–192
- Fathollahzadeh H, Kaczala F, Bhatnagar A, Hogland W (2014) Speciation of metals in contaminated sediments from Oskarshamn Harbor, Oskarshamn, Sweden. Environ Sci Pollut Res 21(4):2455–2464
- Liu Z, Wang Y, Zhu Z, Yang E, Feng X, Fu Z, Jin Y (2016) Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 148:163–170
- MacPhail R, Brooks J, Hunter D, Padnos B, Irons T, Padilla S (2009) Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. Neurotoxicology 30(1):52–58
- Zhao J (2014) Locomotor activity changes on zebrafish larvae with different 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) embryonic exposure modes. Chemosphere 94:53–61
- 49. Wincent E, Jönsson ME, Bottai M, Lundstedt S, Dreij K (2015) Aryl hydrocarbon receptor activation and developmental toxicity in zebrafish in response to soil extracts containing unsubstituted and oxygenated PAHs. Environ Sci Technol 49(6):3869–3877
- Barron MG, Carls MG, Heintz R, Rice SD (2004) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. Toxicol Sci 78(1):60–67
- Kim D-J, Seok S-H, Baek M-W, Lee H-Y, Na Y-R, Park S-H, Lee H-K, Dutta NK, Kawakami K, Park J-H (2009) Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. Toxicol Mech Methods 19(3):251–256
- 52. Sfakianakis DG, Renieri E, Kentouri M, Tsatsakis AM (2015) Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. Environ Res 137:246–255
- 53. Jezierska B, Ługowska K, Witeska M (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiol Biochem 35(4):625–640
- Magnusson-Olsson AL, Lager S, Jacobsson B, Jansson T, Powell TL (2007) Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. Am J Physiol Endocrinol Metab 293(1):E24–E30
- Westerlund L, Billsson K, Andersson PL, Tysklind M, Olsson PE (2000) Early life-stage mortality in zebrafish (*Danio rerio*) following maternal exposure to polychlorinated biphenyls and estrogen. Environ Toxicol Chem 19(6):1582–1588
- Barron MG, Heintz R, Rice SD (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. Mar Environ Res 58(2–5):95–100
- Burgess RM, Ho KT, Brack W, Lamoree M (2013) Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. Environ Toxicol Chem 32(9):1935–1945
- Mathias JR, Saxena MT, Mumm JS (2012) Advances in zebrafish chemical screening technologies. Future Med Chem 4(14):1811–1822
- 59. Legradi JB, Di Paolo C, Kraak MHS, van der Geest HG, Schymanski EL, Williams AJ, Dingemans MML, Massei R, Brack W, Cousin X, Begout ML, van der Oost R, Carion A, Suarez-Ulloa V, Silvestre F, Escher BI, Engwall M, Nilén G, Keiter SH, Pollet D, Waldmann P, Kienle C, Werner I, Haigis AC, Knapen D, Vergauwen L, Spehr M, Schulz W, Busch W, Leuthold D, Scholz S, vom

- Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. J Neurochem 88(2):443–453
- Huang L, Wang C, Zhang Y, Wu M, Zuo Z (2013) Phenanthrene causes ocular developmental toxicity in zebrafish embryos and the possible mechanisms involved. J Hazard Mater 261:172–180
- Rodrigues AC, Henriques JF, Domingues I, Golovko O, Žlábek V, Barata C, Soares AM, Pestana JL (2016) Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. Aquat Toxicol 170:371–376
- 63. Pyle G, Ford A (2017) Behaviour revised: contaminant effects on aquatic animal behaviour. Aquat Toxicol 182:226–228
- 64. Oliveira R, Grisolia CK, Monteiro MS, Soares AM, Domingues I (2016) Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 187:50–61
- Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE (2015) The use of growth and behavioral endpoints to assess the effects of pesticide mixtures upon aquatic organisms. Ecotoxicology 24(4):746–759
- 66. Monteiro LC, Van Butsel J, De Meester N, Traunspurger W, Derycke S, Moens T (2018) Differential heavy-metal sensitivity in two cryptic species of the marine nematode Litoditis marina as revealed by developmental and behavioural assays. J Exp Mar Biol Ecol 502:203–210
- Wang S-Y, Wang GK (2003) Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. Cell Signal 15(2):151–159
- Silver KS, Song W, Nomura Y, Salgado VL, Dong K (2010) Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pestic Biochem Physiol 97(2):87–92
- Irons TD, Kelly PE, Hunter DL, Macphail RC, Padilla S (2013) Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. Pharmacol Biochem Behav 103(4):792–813
- Dishaw LV, Hunter DL, Padnos B, Padilla S, Stapleton HM (2014) Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicits overt toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (Danio rerio). Toxicol Sci 142(2):445–454
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol Appl Pharmacol 196(2):191–205
- Incardona JP, Linbo TL, Scholz NL (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol Appl Pharmacol 257(2):242–249
- 73. Carlsson G, Patring J, Kreuger J, Norrgren L, Oskarsson A (2013) Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (Danio rerio) embryos. Aquat Toxicol 126:30–41
- Jin M, Zhang X, Wang L, Huang C, Zhang Y, Zhao M (2009) Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. Aquat Toxicol 95(4):347–354
- De Gaspar I, Blanquez MJ, Fraile B, Paniagua R, Arenas MI (1999) The hatching gland cells of trout embryos: characterisation of N-and O-linked oligosaccharides. J Anat 194(1):109–118
- Irons TD, MacPhail RC, Hunter DL, Padilla S (2010) Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. Neurotoxicol Teratol 32(1):84–90
- Selderslaghs IW, Hooyberghs J, Blust R, Witters HE (2013) Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. Neurotoxicol Teratol 37:44–56
- Strmac M, Oberemm A, Braunbeck T (2002) Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. J Fish Biol 61(1):24–38
- Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment–applications beyond acute toxicity testing. Environ Sci Pollut Res Int 15(5):394–404

Contents lists available at ScienceDirect





Neurotoxicology and Teratology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neutera

Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME[®]



Afolarin O. Ogungbemi^{a,b,*}, Elisabet Teixido^{a,1}, Riccardo Massei^{c,2}, Stefan Scholz^a, Eberhard Küster^a

^a Department of Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

^b Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, Fortstraße 7, 76829 Landau, Germany

^c Department of Effect-Directed Analysis, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Keywords: Acetylcholinesterase inhibitors Developmental neurotoxicity Behavioral toxicology Spontaneous activity Hyperactivity Alternatives to animal testing

ABSTRACT

Neuroactive chemicals are frequently detected in the environment. At sufficiently high concentrations or within mixtures, they could provoke neurotoxic effects and neurological diseases to organisms and humans. Fast identification of such neuroactive compounds in the environment could help in hazard assessment and risk mitigation. Behavior change is considered as an important endpoint and might be directly or indirectly connected to a neuroactive mode of action. For a fast evaluation of environmental samples and pure substances, we optimized the measurement of a behavioral endpoint in zebrafish embryos - the spontaneous tail coiling (STC). Evaluation of results is automated via the use of a workflow established with the KNIME® software. Analysis duration and developmental stage were optimized to 1 min and 25 ± 1 hpf respectively during measurement. Exposing the embryos in a group of 10 or 20 and acclimatizing for 30 min at room temperature proved to be reliable. The optimized method was used to investigate neurotoxic effects of 18 substances with different modes of action (MoA). The STC test accurately detected the effect of 8 out of 11 neuroactive substances (chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, diazinon, paraoxon-methyl, abamectin, carbamazepine, propafenone and diazepam). Aldicarb and nicotine showed subtle effects which were considered to be conditional and imidacloprid showed no effect. For substances with unknown neuroactive MoA, 3 substances did not provoke any effect on the STC (pyraclostrobin, diuron and daunorubicin-hydrochloride) while 4 other substances provoked an increased STC (hexaconazole, aniline, dimethyl-sulfoxide and 3,4-dichloroaniline). Such unexpected effects indicate possible neuroactive side effects or unknown mechanisms of action that impact on the STC. In conclusion, the optimized STC parameters and the automated analysis in KNIME[®] indicate opportunities for the harmonization of the STC test and further development for prospective and diagnostic testing.

1. Introduction

Neuroactive substances are frequently detected in the environment and environmental concentrations may induce adverse effects such as neurological damage in humans and in the ecosystem (Busch et al., 2016). To prevent neurotoxic hazard, it is necessary to develop new, fast and sensitive toxicological tests to screen neuroactive substances. Behavior tests such as locomotor activity are considered to be sensitive and specific to detect neurotoxic effects since it is anticipated that behavior is directly or indirectly related to the function of the nervous system. Such behavior tests have been utilized for both drug development and toxicity testing in animals such as rodents, fish and amphibians (OECD, 2007a; OECD, 2007b; Parker, 2016; Tierney, 2011). However, alternative techniques are required to reduce the time, cost and number of animals in developmental neurotoxicity testing (Bal-Price et al., 2015). Currently early life stages of fish are particularly

https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106918 Received 27 April 2020; Received in revised form 21 July 2020; Accepted 22 July 2020 Available online 27 July 2020

0892-0362/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Department of Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany.

E-mail address: afolarin.ogungbemi@ufz.de (A.O. Ogungbemi).

¹ Present address: GRET-Toxicology Unit, Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

² Present address: Zebrafishlab, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium.

gaining wide acceptance for use in behavior testing due to the nonprotection of these stages as well as possibility for small-scale and high throughput testing (Basnet et al., 2019; Braunbeck et al., 2005; Legradi et al., 2015; Ogungbemi et al., 2019; Scholz et al., 2013).

In particular, zebrafish embryos represent an attractive toxicity testing model for several reasons: its small size allows the use of low quantity exposure solution, its fast development makes it amenable to short duration testing and its transparency enables the assessment of developmental effects and protocols for the assessment of early behavioral features such as spontaneous tail coiling are available (Hill et al., 2005; Scholz et al., 2013). Furthermore, due to the conservation of principal mechanisms of neurotoxicity in animals, testing of zebrafish embryos also allows extrapolation to other species including humans. A previous review of different zebrafish embryo behavior tests (Ogungbemi et al., 2019) had indicated that the spontaneous tail coiling (STC) of zebrafish embryos could represent a reliable endpoint to detect neurotoxicity and hence this endpoint was selected for further optimization in the present study. The STC consists of single or alternating tail coilings which can be observed as early as 19 h post fertilization (hpf) in the developing embryo (Kimmel et al., 1974; Saint-Amant and Drapeau, 1998). The observed tail coilings are assumed to occur as a result of innervation of the muscle by the primary motor neurons and therefore, measurement of the STC frequency could be a good indicator of adverse effects to the function and development of the muscle innervation or generally the nervous system.

In previous studies, the STC test has been used to analyze effects of neuroactive chemicals such as abamectin, chlorpyrifos, carbamazepine etc. (Cheng et al., 2017; Selderslaghs et al., 2010; Vliet et al., 2017; Weichert et al., 2017). STC response of these chemicals relative to negative control appears to be a promising technique to predict either the stimulatory or inhibitory mode of action (MoA) of neuroactive compounds (Ogungbemi et al., 2019). For example, the hyperactivity (referring to increased STC) effect of chlorpyrifos-oxon may be correlated to its stimulatory action when it inhibits acetylcholinesterase enzyme while the hypoactivity (decreased STC) effect of abamectin may be linked to its inhibitory action when it activates gamma aminobutyric acid (GABA) receptors (Raftery and Volz, 2015).

However, reports on the use of the STC test method vary in their experimental protocol and how effects are estimated. This may lead to lack of reproducibility and usability of results for the identification of specifically acting neuroactive substances. For instance, differences in effect concentration for abamectin may be attributed to the use of different exposure material (Ogungbemi et al., 2019; Raftery et al., 2014); different effect concentrations for dichlorvos may relate to the use of different endpoint - frequency or duration of STC (Watson et al., 2014; Zindler et al., 2019); inconsistent effects (hyper- or hypoactivity) were also reported for paraoxon and this could be attributed to estimating the endpoint in different ways - percentage of embryos showing STC versus frequency of STC (Ogungbemi et al., 2019; Yozzo et al., 2013); and different substances were indicated as potential neurotoxic depending on a short (2 h) or a long (23 h) exposure duration (Vliet et al., 2017). Other experimental parameters such as age or developmental stage of embryo, duration of behavioral analysis and sample size could influence the STC result leading to incoherent interpretations. Richendrfer et al. (2014) also showed that variation in the age of embryo in reported STC studies could influence behavioral analysis. Hence, there is a need to optimize these experimental parameters for appropriate interpretation of neurotoxicity. Crofton et al. (2011) suggests a list of guidelines to develop alternative test methods for developmental neurotoxicity testing. These recommendations could also facilitate validation of the STC test for the use in hazard assessment and effect-based environmental monitoring.

The aim of the present study was to investigate the influence of experimental parameters on the STC response and to develop an optimized STC test for screening neuroactive compounds. We optimized important experimental parameters and created an automated workflow to measure the STC in the open access software KNIME* (Berthold et al., 2009). Subsequently, we implemented the guidelines recommended by Crofton et al. (2011) to establish an optimized STC protocol. We tested the new protocol on 18 chemicals with different modes of action - either with an expected activation or inhibition of movement or without any expected effect.

2. Materials and method

2.1. Test organism

Fish cultivation, feeding and embryo collection was conducted as described previously (Massei et al., 2015). Briefly, two strains of adult zebrafish (OBI and WIK strains) were crossed to produce a hybrid strain (OBI-WIK strain, F3 generation) in order to avoid inbred effects. The strain was cultured under 14 h light/10 h dark photoperiod in 120 L aquaria (tap water, 26.5 ± 1 °C). Spawning trays were inserted on the afternoon 4–6 h before the end of the light cycle. To initiate spawning, lights were automatically switched on at 8 am the following day and eggs were collected at 9 am inside a rectangular glass dish covered with a stainless steel sieve. Fertilized and normal embryos were selected according to Kimmel et al. (1995) with a binocular microscope and embryos between 16 and 128 cell stage were used for the experiments.

2.2. Media and chemicals

Information about the purity and manufacturer of all chemicals are shown in SI Table S1. Stock solutions were prepared either in ISO water as specified in ISO 7346-3 (1996) [80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MgSO₄·7H₂O, 31 mM NaHCO₃, 3.1 mM KCl] or in 100% dimethylsulfoxide (DMSO). All chemicals were dissolved in DMSO except; imidacloprid, 3,4-dichloroaniline, aniline, daunorubicin-hydrochloride, diazinon and nicotine. For preparation in ISO water, test chemicals (except liquid substances) were prepared a day before exposure and left to stir overnight for dissolution. The DMSO stock solutions were diluted to lower concentrations in ISO water during exposure and the DMSO concentrations varied along the dilution series but never exceeded 0.1% (v/v) in diluted solutions.

2.3. Chemical exposures

The chemicals were grouped by their expected effects in the STC in relation to their known mode of action: chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, diazinon, paraoxon-methyl, aldicarb, imidacloprid and nicotine were anticipated to represent hyperactive chemicals; abamectin, carbamazepine, diazepam and propafenone were considered to represent hypoactive chemicals; chemicals with unknown neuroactive mode of action or without any expected effect to the STC were represented by diuron, aniline, pyraclostrobin, hexaconazole, daunorubicin-hydrochloride, DMSO and 3,4-dichloroaniline. Exposure concentrations are given in SI Table S1 and these were selected based on mortality data from published literature or in-house unpublished mortality data. Briefly, twenty fertilized embryos (1-3 hpf) were exposed in 20 mL of diluted stock solution or ISO water as control, within a 60 mm glass crystallization dish covered with a watchmaker glass. A solvent control was used when the substance was dissolved in DMSO. The exposed embryos were incubated at 28 °C under 14 h light/10 h dark photoperiod for 21 \pm 1 h. The exposure was conducted using 2 technical parallel replicates and at least 2 independent replicates to get sufficient amount of data for the concentration-response modeling. pH of the highest concentration and control solution were measured before and after the experiment to control for possible changes within the exposure time.

2.4. Measurement of the spontaneous tail coiling (STC)

At 24 hpf, exposed embryos were removed from the incubator and allowed to acclimatize to room temperature for at least 30 min. Embryos were inspected for lethality/malformations and affected embryos were separated. Samples with less than 20% affected embryos were considered valid for STC assessment. Videos of normally developed embryos were recorded for 60 s (frame rate of 2 frames per second) with a video camera (Olympus DP21, Hamburg, Germany) mounted to an Olympus SZX7 stereomicroscope ($0.8 \times$ magnification). The embryos were recorded in groups of 20 using a black background and dark field transmitted light at the base of the microscope, with an ISO speed of 400, time of exposure of 1/80 and image size of 400×300 pixels. Collected videos were analyzed for STC counts by means of a workflow using the KNIME® Analytical Platform (Berthold et al., 2009). Occasionally two tail coilings appear very close together. In such cases the camera setting of 2 frames per second could not resolve them as individual coilings, these were counted manually.

2.5. Influence of experimental parameters

2.5.1. Exposure duration and developmental stage of analysis

To investigate the optimal exposure duration or developmental stage during behavior analysis for zebrafish embryos in the STC test, 20 embryos (< 3 hpf) were exposed in ISO water and STC was measured hourly starting from 21 hpf to 31 hpf. This experiment was conducted with 3 technical replicates.

2.5.2. Acclimation duration

STC measurement and video recording were not undertaken in temperature controlled chambers. As a result, to investigate the influence of temperature changes during acclimation time (after removal from the incubator at 28 °C and before STC measurement) on the STC response, 20 embryos per treatment were exposed in ISO water and temperature was measured during acclimation. Treatment 1 = control (no acclimation); Treatment 2 = 15 minute acclimation at room temperature; Treatment 3 = 30 minute acclimation at room temperature. After incubation, treatment 2 and 3 were removed from the incubator at 15 and 30 min respectively before STC measurement. Treatment 1 was not acclimatized under room temperature but measured as immediately possible. Three technical replicates were used for all treatments and STC measurement was conducted between 24 and 25 hpf for all embryos.

2.5.3. Sample size

To evaluate the effect of simultaneously reducing sample size (20 to 10 embryos per replicate) and increasing the number of replications (3 to 5 replicates) on variability of the STC response, two treatments were considered. In the first treatment, 20 embryos of 3 replicates were exposed in ISO water. 10 embryos of 5 replicates were used in the second treatment. The experiment was repeated thrice and STC measurement was conducted between 24 and 25 hpf. Additionally, already collected and analyzed STC control data were reanalyzed by estimating the mean of 10 embryos in comparison to the mean of 20 embryos per sample.

2.5.4. Analysis duration

The impact of reducing the analysis duration of the STC was investigated. STC data for abamectin and chlorpyrifos were re-analyzed in the KNIME[®] workflow in which the recorded video of 60 s was segmented into different time bins of 60, 30, 20 and 10 s.

2.5.5. Rearing condition

To test if the movement of one embryo might stimulate the movement of other nearby embryos and therefore accidentally influence outcome, we reared embryos with ISO water in single or group conditions. In single condition, 10 embryos were individually placed in 10 glass crystallization dishes and in 2 replicates (one embryo per dish per 10 dishes and a total of 20 dishes). Group condition was implemented by placing 10 embryos in a group within the same dish (10 embryos per dish and 2 replicates per dish). STC measurement was conducted between 24 and 25 hpf.

2.6. Image analysis parameters

To optimize the image analysis of STC in KNIME®, we investigated the influence of parameters like threshold (thrs) and the so called smoothing parameter (spar) used for identification of peaks within the R-snippet node in KNIME®. Threshold is the value beyond which the STC counts as one. Any response below this value was attributed to noise. The higher the threshold, the lower the sensitivity. Smoothing parameter is responsible for the smoothing of the response peak signal. Smoothing removes small peaks assumed to represent signal noise. The higher the smoothing parameter, the lower the peak signal, and hence the lower the sensitivity to detect small peaks or the higher the possibility that smaller peaks will be counted as noise. These parameters were manipulated or changed in an R script (function smooth.spline and test peaks within dcpR package) embedded in KNIME®. Manipulated threshold values were - 0.001, 0.002, 0.003, 0.004 and 0.005 while smoothing parameter values - of 0.1, 0.2 and 0.3 were applied. The analysis was done by varying the threshold parameter for each level of the smoothing parameter. Three independent experiments were conducted for untreated embryos. The resulting STC response in KNIME® was then compared to a manual STC count.

2.7. Data analysis

STC was expressed as the number of STCs per minute (frequency) for one embryo. The mean STC frequency was estimated for a group of 20 embryos that were subject to the same treatment. The absolute STC frequency varied between the independent experiments while the trend provoked by treatments was conserved. To combine results from independent experiments, a normalized percentage mean STC frequency was obtained by dividing the mean STC frequency by the respective mean STC frequency for control embryos and multiplying by 100. Data for hypoactivity modeling were further treated by adding 100 to convert the negative values to positive. Concentration-response modeling of the percentage STC frequency was performed using the 4-parameter logistic function (LL.4) of the drc package in R (Ritz and Streibig, 2005).

$$y = c + \frac{(d-c)}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

where b is the slope function; c and d are the minimum and maximum STC response respectively; and e is the EC_{50} .

In cases of hyperactivity, the maximum parameter d in the model was fixed as the highest hyperactivity response. The effect concentration causing 10 and 50% increase or decrease of the STC was estimated from the concentration-response curve. Some compounds showed biphasic response (i.e. initial hyperactivity and declining hypoactive response at higher concentrations). The hypoactivity at higher concentration could be a result of strong seizures due to over-excitation or represent a result of subtle malformation and overt toxicity (Behra et al., 2002; Stehr et al., 2006). Hence, these data were not included in constructing concentration-response models. Hypothesis testing was used to check for differences in experimental parameters. Shapiro test and Bartlett test were used to check for normality and homogeneity of variance, respectively. Analysis of variance or Friedman test were used to test for statistical differences between treatment groups. Bonferroni adjusted Wilcoxon signed-rank test was used as a post-hoc test. Statistical difference was considered when the p-value < 0.05. Sensitivity ratio (SR) was calculated by dividing the available LC50 data with the



Fig. 1. Effect of exposure duration (or developmental stage) on STC response for untreated embryos. Embryos were incubated at 2 hpf at 28 °C and monitored at 21 hpf hourly till 31 hpf. Twenty embryos were measured per replicate. Data points show mean value of 3 replicates and error bars represent standard deviation.

STC EC₅₀ data (Bittner et al., 2019). SR > 1 means the STC EC₅₀ is more sensitive than LC_{50} i.e. STC effect is observed at a factor (factor of SR) lower concentrations than lethal effect and vice versa when SR < 1. Low SRs close to 1 indicate that the effect on STC was observed close to mortality.

3. Results

3.1. Influence of experimental parameters

The spontaneous tail coiling (STC) frequency depends on the developmental stage used for the assessment. This has been reported previously (Cheng et al., 2017; Saint-Amant and Drapeau, 1998) and was confirmed for our experimental setup. A weak STC frequency (1 count per minute) was observed at 21 and 22 hpf, with maximum values (3.5 counts per minute) at 23 and 24 hpf, followed by a gradual decline until 31 hpf (Fig. 1). Acclimation duration does not affect the STC response when acclimation under room temperature is ≤ 30 min. After removal of the exposure dish from the incubator (28 °C), the measured temperature of the solution was ≈ 25 °C and this declined to a stable value of 22.8 $^\circ\!\mathrm{C}$ after 30 minute acclimation under room temperature (SI Tables S2 and S3). There were no statistical differences (p-value = 0.542) in STC response between control (no acclimation), 15 minute acclimation and 30 minute acclimation. Sample size manipulation did not seem to affect the variability of the STC after reducing the number of embryos in a dish from 20 to 10, and simultaneously increasing the number of replicates from 3 to 5. The means and standard deviations of the different setups were similar (SI Table S4). Additionally, analyzing a sample size of 10 and 20 embryos from the same dish resulted in no observable differences (SI Fig. S1). Single or group rearing conditions did not seem to influence the STC response. A comparison of standard deviations shows there is no difference between both setups and this suggests that group exposure does not probably cause contagious stimulation of STC in neighboring embryos (SI Fig. S2). To evaluate the influence of analysis duration on STC response, we selected typical hyperactive (chlorpyrifos) and hypoactive (abamectin) substances. Comparing the STC frequency for different analysis duration of 60, 30, 20 and 10 s shows a slightly declining STC trend from 60 to 10 s in all the dataset considered (Fig. 2). However, this decline was not statistically significant.

3.2. Influence of image analysis parameters

Two parameters used for image analysis namely threshold (thrs) and smoothing-parameter (spar) can particularly influence the calculation of STC counts in the KNIME^{*} workflow. The comparison of different threshold and smoothing parameters show an inverse relationship between STC response and threshold or smoothing-parameter (Fig. 3). This trend was most obvious for the smoothing parameter of 0.1. To obtain optimal parameter setting with results similar to manual STC count, smoothing- and threshold were selected as 0.0025thrs/0.1spar, 0.002thrs/0.1spar and 0.0035thrs/0.2spar for the 3 independent replicates respectively. Based on visual observation of the graphs (Fig. 3) we selected 0.003thrs/0.1spar parameters for all subsequent analysis given that these parameters were showing the highest concordance with manual analysis.

3.3. Effect of chemicals in the STC test

Effect concentrations of all chemicals are reported in Table 1. Observed STC effects for each chemical were compared to the expected effect based on the chemical's mode of action. Among chemicals which are expected to cause hyperactivity; diazinon, chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon and paraoxon-methyl displayed a clear hyperactivity response with EC₅₀s of 5.24, 1.85, 0.32 and 4.13 µM respectively (Fig. 4). Additionally, the hyperactivity for chlorpyrifos-oxon peaked at 1 µM and started to decline at 1.76 µM. Diazinon caused up to 50% mortality at 10 μ M while paraoxon-methyl at 100 μ M caused sublethal effects such as incomplete tail coiling and reduced-resorption of the yolk sac (SI Fig. S3). Nicotine and aldicarb also showed subtle hyperactivity at EC₅₀s of 0.97 and 29.6 µM respectively (Fig. 4). However these hyperactivity effects were not consistent and highly variable, hence we considered them as conditional effects. To test the influence of exposure duration as an explanation for lack of clear nicotine effect, embryos were exposed to nicotine for 20 min between 24 and 25 hpf. In contrast to the longer duration exposure in which only mild effects were observed, nicotine induced clear hyperactivity in all tested concentrations of 10, 20, 30, 40 µM (SI Fig. S4). Imidacloprid showed no effect in the STC test up to 2000 µM.

Among chemicals which are expected to cause hypoactivity; abamectin, carbamazepine, diazepam and propafenone all caused hypoactivity with EC_{50} s of 0.055, 271, 20.9 and 31.6 μ M respectively (Fig. 4). Additionally, diazepam at 50 and 100 μ M induced sublethal effects such as reduced-resorption of the yolk sac and oedema of the pericard.

In search for negative control substances, different chemicals which do not have a known neuroactive mode of action were tested. Diuron, an herbicide, showed no significant effect up to 8 µM and caused 100% mortality at 16 µM. Daunorubicin-hydrochloride, an antimitotic drug showed no STC effect up to 50 µM. Pyraclostrobin, a fungicide showed no STC effect up to 0.14 µM (SI Fig. S5). Higher concentrations of 0.2 and 0.25 μ M caused sublethal effects, such as reduced-resorption of the volk sac, no tail detachment and no clear formation of the head, which could be indications of developmental delay (SI Fig. S3), while 0.4 µM caused between 50 and 100% mortality. Aniline, a known baseline toxic/narcotic substance caused hyperactivity at EC_{50} of 832 μ M while 3000 µM induced 100% mortality. 3,4-Dichloroaniline, a precursor and metabolite of diuron also caused hyperactivity at EC₅₀ of 5.79 µM. Hexaconazole, a fungicide, caused hyperactivity (EC₅₀ = 4.03μ M) up to a maximum concentration of 15 µM and higher concentration of 25 µM caused a decline of the activity towards control level (Fig. 4). DMSO, a commonly used solvent induced hyperactivity at EC₅₀ of 275,455 µM (1.96%).

4. Discussion

Screening and detection of neuroactive substances is a major challenge in environmental protection. Assessment of animal behavior as an integrative endpoint appears to be a very promising approach to screen for compounds with diverse neuroactive mode of actions. In fact, zebrafish embryo behavior tests are considered to fill the gap for the



Fig. 2. Comparison of STC frequency from different analysis duration of 60, 30, 20 and 10 s. Analysis was done for chlorpyrifos and abamectin at specific concentrations showing effect on the STC. Chlorpyrifos control and abamectin control refer to DMSO solvent control. Data points show mean value of 3 replicates and error bars represent standard deviation. A Friedman test showed no statistical significant difference (p-values of 0.042, 0.72, 0.80, 0.085) between the analysis duration of each treatment (chlorpyrifos control and 1um; abamectin control and 0.055 respectively). A further Wilcoxon sign-rank post-hoc test for chlorpyrifos control showed no statistical significance.

probable insufficient capacity of the fish embryo test (FET) to screen neuroactive compounds (Sobanska et al., 2018; Klüver et al., 2015). However, systematic assessment of the predictivity and reliability of behavior endpoints are lacking. Available behavioral methods such as the locomotor response test, spontaneous tail coiling test and photomotor response test (reviewed in Ogungbemi et al., 2019) are either not sufficiently specific to detect only neuroactive substances or they are restricted in their diagnostic capacity to detect a wide range of neuroactive substances. Behavior tests used in regulation also require conduction of experiments with adult animals which are subject to ethical concern and are cost- and labor-intensive (OECD, 2007a, 2007b). To exploit alternatives to animal testing, we explored the reliability of the spontaneous tail coiling (STC) test as an alternative screening system for the detection of (developmental) neurotoxic compounds. The STC test represents one of the available fish embryo behavior tests and has been proposed to detect chemicals interfering with motor neurons. However, a limited diagnostic capacity of the STC could occur because of 1.) Possible incapability to reveal responses in the brain due to effects being majorly propagated from the spinal cord; 2.) possible limited biotransformation capacity of early stages of the embryo; 3.) probable low internal concentration of chemicals that are slowly taken up (e.g. charged or hydrophobic compounds); and 4.) possible limited uptake of high molecular weight substances due to the chorion (pore-size) barrier. At present, it is difficult to estimate the diagnostic capacity given that diverse protocols are used for STC assessment. Hence, it is necessary to characterize the extent of sensitivity and specificity of different test setups and associated parameters. Crofton et al. (2011) described a set of guidelines for developing and optimizing alternative tests for developmental neurotoxicity. We used these guidelines to characterize the capacity of the STC test to detect neuroactive substances. In the present study, we assessed the influence of experimental parameters on the variability and reproducibility of the STC response. An optimized experimental protocol was then validated using 11 chemicals known to interact with the nervous system and 7 others which are not primarily known to disrupt or affect the nervous system.

4.1. Discussion of the STC test performance in relation to guidance for (developmental) neurotoxicity testing

4.1.1. Key event of neurodevelopment - endpoints should model key aspects of neurodevelopment

Spontaneous tail coiling (STC) represents the first motor activity generated by the developing neural network which occurs as a result of the innervation of the muscle and is assumed to support hatching of the embryo from its chorion (Kimmel et al., 1974; Saint-Amant and

Drapeau, 1998). The STC is presumed to be generated by depolarizations which trigger action potentials in the synapses of the primary motor neurons (Drapeau et al., 2002). These synapses leading to STC are assumed to be mainly due to an electrically coupled network in the spinal cord (Saint-Amant and Drapeau, 2000). This raises uncertainties about the contribution of chemical neurotransmitters to mediate the observed STC or if they are present at this early stage of development. Tufi et al. (2016) measured different neurotransmitters including acetylcholine and GABA in 24 hpf embryos and hence the presence of neurotransmitters at early stages of development is established. Some other studies have shown significant involvement of neurotransmitter receptor interaction. Acetylcholine and nicotine induced hyperactive STC in 28 hpf embryos and this is considered to be a result of activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (Thomas et al., 2009). STC response was also abolished (hypoactivity) in a sodium channel knockdown mutant in 24 hpf embryos (Chen et al., 2008). Spasmodic STC behavior and later-on paralysis was observed in an acetylcholinesterase (AChE) knockdown mutation in 27 hpf embryos and this could be due to the over-excitation of the acetylcholine receptors by undegraded acetylcholine (Behra et al., 2002). Moreover, embryonic response was abolished by cholinergic blockers - bungarotoxin and dtubocurarine in 28 hpf embryos (Grunwald et al., 1988; Saint-Amant and Drapeau, 1998). These results suggest that both electrical and chemical induced synapses at least play a part in mediating the STC response and hence, the STC endpoint is able to reveal effects of neuroactive chemicals on the synapses at an early zebrafish embryo age of 24 hpf.

4.1.2. Endpoint measurement - correct and accurate measurement of the endpoint

Measurement of the STC can be conducted by manually counting the coiling frequency or by analyzing videos with an automated workflow in KNIME[®]. Counts of the STC are normalized against control embryos to infer hyper- or hypoactivity. A detailed analysis was undertaken to compare the output of the automated analysis in KNIME[®] with manual counting. The results shown in Fig. 3 indicate the accuracy of the automated analysis in KNIME[®]. Nevertheless, it is recommended to implement a correction protocol (as in Section 4.1.4.4) to control for potential errors.

4.1.3. Dynamic range - determination of the extent of measurable change

The STC's provide a dynamic range that allows to detect hyper- and hypoactivity effects relative to the control within the same assay. These effects can be quantified using hypothesis testing or dose-response modeling. The average STC count for untreated embryos can vary between 2 and 5 cpm between experiments. Fig. 5 shows the distribution







C)



Fig. 3. Effect of threshold (thrs) and smoothing parameter (spar) for comparison of results to manual counting of STCs are shown. A, B and C represent 3 independent experiments. Increase in threshold or spar leads to a decrease in the STC response. For subsequent analysis, parameters were selected that resulted in highest concordance between manual and automated assessment of STC frequency.

of negative and solvent controls for all chemicals tested. An average STC count of 3.3 ± 0.85 /min was estimated for a pool of 94 replicates measured on different days. However, the effect trend of chemical exposures on different days are conserved. Therefore, we have normalized all data with respect to individual control from independent experiments and this could demonstrate reproducibility of the effects and allows for extensive concentration-response modeling.

4.1.4. Parametric controls - assay parameters that predictably change the endpoint

4.1.4.1. Effect of development stage

To characterize the intrinsic behavior of a specific zebrafish strain, it is important to investigate the optimal STC response across different developmental stages or ages for that particular strain. Varying developmental stages from 21 hpf till 31 hpf showed an initial low response which then rapidly increased and peaked around 23 and 24 hpf, followed by a gradual decline until 31 hpf (Fig. 1). To explore a high sensitivity of STC test, it is beneficial to measure during the peak response (23-25 hpf) in untreated embryos. Nevertheless, the full dynamic range and diagnostic capacity can be explored by measuring during a wider range of development stage (19–28 hpf). Similar to our result, Chen et al. (2012) reported control STC peak of 5 cpm at 22, 23 and 24 hpf. Saint-Amant and Drapeau (1998) characterized STC in dechorionated embryos and they did not only find significantly higher frequency (60/min), but peak STC was observed at 19 hpf. We observed similar high frequency of \approx 35/min when embryos were dechorionated at 24 hpf (SI Movies 1 and 2). Thomas et al. (2009) also reported peak STC at 19 hpf and higher STC counts for dechorionated embryos. This discrepancy in STC counts for dechorionated embryos could be due to the excessive stimulation as a result of direct contact with ionic media containing potassium chloride (Thomas et al., 2009). To obtain robust toxicological information, it is recommended to measure the STC of the fish strain at use over several time points to understand the intrinsic variability of that strain.

4.1.4.2. Effect of analysis duration. Shorter analysis duration may allow to increase the throughput of STC tests. Therefore, we investigated the effect of different analysis duration of 60, 30, 20 and 10 s. The results show a trend in which the STC frequency slightly declined across the durations from 60 to 10 s (Fig. 2). Even though the decline was not statistical significant, it could mean a loss of STC peak information when shorter durations are used. Raftery et al. (2014) utilized lower duration of 6 s and they reported that lower sensitivity observed could be due to short duration. Shorter durations could be problematic especially for hypoactivity effects in which an embryo could give only one peak which could occur at any time-point within a duration of 60 s. In such cases, a 60 s duration may be more robust to capture the STC response. Nevertheless shorter durations of 30 and 20 s also appear to be mildly robust and could be used within a miniaturized setup.

4.1.4.3. Effect of acclimation, sample size and rearing conditions. Some experimental parameters did not seem to influence the STC response. For example, acclimation time did not cause any change in STC counts within a duration of 30 min, even though the temperature declined from incubation temperature of 28 °C to room temperature of 22.8 °C (SI Table S3). Vliet et al. (2017) also found no effect of acclimation temperature on STC response when embryos were acclimatized for 1 h at different temperatures. However, Saint-Amant and Drapeau (1998) reported 40% decline in STC after acclimatization to room temperature. They did not state the duration of acclimation and a confounding effect of developmental stage or the use of dechorionated embryos could be responsible for their observed decline in STC response. Nevertheless, we implemented an acclimation period of 30 min before measurement in our STC protocol. Manipulation of sample size by reducing number of embryos in a dish from 20 to 10 and increasing number of replicates from 3 to 5 did not seem to affect the variability of the STC (SI Table S3). Additionally, mean of 10 embryos appear to have similar STC response with mean of 20 embryos and therefore, 10 embryos could be used within a miniaturized setup or when lower exposure volume is required. Studies on rearing conditions show that group exposure conditions do not cause contagious stimulation of the STC due to movement of neighboring embryos (SI Fig. S1). However, older embryos raised in groups showed a higher locomotor activity than those raised individually after the first 5 days of development (Zellner

Table 1

Summary of STC effect characterization for all chemicals exposed to zebrafish embryos. Data collected in the present study are effect concentrations and confidence intervals (in parenthesis). Expected activity was inferred from the mode of action of each chemical.

Substance	Mode of action ^h	Expected activity	Observed activity	STC EC ₁₀ (μΜ)	STC EC ₅₀ (μM)	0–48 hpf LC_{50} (μ M)	Baseline toxicity ⁱ (μ M)	Sensitivity ratio LC ₅₀ /EC ₅₀
Chlorpyrifos	Acetylcholinesterase inhibitor	Hyperactivity	Hyperactivity	0.35 (0.11-0.59)	1.85 (1.37-2.33)	5.4 ^c , ^d	1.85	2.9
Chlorpyrifos oxon	Acetylcholinesterase inhibitor	Hyperactivity	Hyperactivity	0.047 (0.003-0.09)	0.32 (0.2-0.43)	1.5 ^g	54.1	4.7
Diazinon	Acetylcholinesterase inhibitor	Hyperactivity	Hyperactivity	3.46 (2.3-4.6)	5.24 (4.58-5.9)	19.7 ^d	17.7	3.7
Paraoxon-methyl	Acetylcholinesterase inhibitor	Hyperactivity	Hyperactivity	0.81 (-2.12-3.74)	4.13 (1.36-6.9)	230^{d}	1097	55.7
Aldicarb	Acetylcholinesterase inhibitor	Hyperactivity	Hyperactivity	_	29.6 ^a (-2.16-2.75)	279.9 ^c , ^d	7967	9.4
Nicotine	Nicotinic acetylcholine receptor agonist	Hyperactivity	Hyperactivity	0.69 ^a (-1.79-3.19)	0.97 ^a (0.09–1.85)	3353 ^e	6792	3456
Imidacloprid	Nicotinic acetylcholine receptor agonist	Hyperactivity	No effect	-	-		28,556	-
Abamectin	Activation of GABA- gated chloride channel	Hypoactivity	Hypoactivity	0.015 (0.0039-0.026)	0.055 (0.035-0.074)	0.7 ^g	4.61	12.7
Propafenone	Sodium channel blocker	Hypoactivity	Hypoactivity	9.5 (2.8–16.3)	31.6 (23-40)	81 ^f	45.1	2.56
Carbamazepine	Sodium channel blocker	Hypoactivity	Hypoactivity	104 (-0.99-209)	271 (193–350)	263 ^f	393.1	0.97
Diazepam	GABA receptor agonist	Hypoactivity	Hypoactivity	14.8 (6.4–23.2)	20.9 (15.3-26.5)		169.1	8.1
Pyraclostrobin	Respiration inhibitor	No activity	No effect	-	-	0.26 ^b , ^e	9.14	-
Diuron	Photosystem II inhibitor	No activity	No effect	-	-	12.6 ^b , ^f	233	-
Aniline	Narcosis	No activity	Hyperactivity	736 (583–890)	832 (734–930)	1910 ^b , ^e	8929	2.3
Daunorubicin HCl	Topoisomerase II inhibitor	No activity	No effect	-	-	110 ^e	2029	-
Hexaconazole	Inhibits ergosterol biosynthesis	No activity	Hyperactivity	1.18 (-0.106-2.47)	4.03 (1.78-6.28)	65 ^f	22.2	16
3,4 dichloroaniline	Metabolite of diuron	No activity	Hyperactivity	2.18 (-0.4-4.75)	5.79 (2.53-9.05)	15.2 ^b , ^f	222.3	2.6
Dimethyl sulfoxide	Solvent	No activity	Hyperactivity	275,455 (232094–318,817)	213,851 (-83,686-511,389)	454,755 ^f	2,272,479	1.65

^a Conditional effect due to inconsistency between replicates.

^b Data for 0–24 hpf.

^c Data for 0–96 hpf.

^d Data from Klüver et al. (2015).

^e Data from Birke and Scholz (2019).

^f Unpublished data of the Helmholtz Centre for Environmental Research.

^g Data from Weichert et al. (2017).

^h Mode of action was obtained from different sources including http://drugbank.ca, pesticide properties database (https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/index.htm) and published literature. ⁱ Baseline toxicity is the lethal concentration predicted from lipophilicity estimated from Klüver et al. (2016).



Fig. 4. Concentration-response curves for chemicals impacting on the frequency of spontaneous tail coiling. Y-axis represents spontaneous tail coiling normalized to control and X-axis shows the exposure concentration. Different symbols represent independent experiments. Upward curves indicate hyperactivity effect with respect to controls while downward curves indicate hypoactivity effect.

et al., 2011).

4.1.4.4. Effect of image analysis parameters. To determine the optimal parameters for automated video-based STC analysis consistent with manual STC counting, we investigated the influence of threshold (thrs) and smoothing-parameter (spar) in peak detection analysis. Results show that both factors are equally influential such that an increase in one parameter needs to be balanced by the decrease in the other to obtain results consistent with manual counts. This is obvious because an increase in the smoothing-parameter will reduce the signal and a decrease in threshold will capture a reduced signal. Balance ratio of smoothing-parameter to threshold of 40 (0.1/0.0025), 50 (0.1/0.002) and 57 (0.2/0.0035) revealed similar in comparison to manual STC counts for untreated zebrafish embryos. It is important to note that some other confounding factors can influence the STC peak analysis. For example, uncontrolled events such as strong signal from movement of whole embryo, unstable videos with background changes in pixels, many weak peaks close to the threshold and inaccurate accountability of fast multiple peaks may influence the STC response.

The use of 0.003thrs/0.1spar parameterization can handle some of these challenges. To ensure high quality STC data, it is also recommended to re-check the video and peaks for these potential errors and correct them accordingly in the initial setup. For example, our recommended KNIME® parameter produced 10% deviation from the true count in one of the independent replicates because of the strong effects of moving embryos. In such cases, manual correction will be more effective than changing the KNIME® parameters. A possible correction workflow can be: 1. Check for moving embryos 2. Visually inspect the peaks for errors. Irregular shaped and wide peaks are suspects 3. Manually count problematic embryos or peak areas.

4.1.5. Response characterization - level of change determined to be an effect The STC response which is considered to be a significant effect can be characterized using hypothesis testing or fitting a dose response model for ECx estimation. A response in hypothesis testing is defined as probability value below the threshold of 0.05. In this study, we used dose-response modeling to estimate EC_{10} and EC_{50} responses. This method was capable of accurately characterizing hyper- and hypoactivity responses in the STC test. In this study we did not consider or characterize the amplitude of STC or differentiate between strong and weak STC response.

4.1.6. Concentration range - methods must be designed to allow determination of concentration-response

It is generally recommended to test a minimum of 5 concentrations to enable concentration-response modeling (OECD 236; Crofton et al., 2011). The STC test as devised in this study allows the convenient assessment of 15–20 dishes within a duration of ≈ 30 min by a single person. STC assessment within a 30 minute time-frame reduces possible influences of changes in developmental stage on the STC response. In order to detect an STC effect, it is also essential that the concentration range covers the effective range of the chemical. Hence, no fixed concentration range should be applied. In contrast concentration ranges need to be adjusted for individual chemicals. For example, carbamazepine was only effective in the STC test after extending the concentration range from 0-80 µM to 0-500 µM. Crofton et al. (2011) recommends 5 logs below the solubility limit of the chemical and we recommend to use, depending on the data available, maximum lethal concentrations of LC50/2 or LC10 as starting concentrations to avoid unspecific sublethal effects. Additionally, conducting an initial rangefinding test may allow to consider lab-specific factors such as zebrafish strain and rearing conditions.

4.1.7. Endpoint selectivity - discrimination of the endpoint of concern from non-specific outcomes

It is possible to assess non-specific outcomes such as developmental





Fig. 5. Histogram and density plot showing the distribution of 94 negative/ solvent controls measured on different days.

malformations during STC measurement. The effects on STC should be compared to effect concentrations for malformations or lethality in order to estimate the specificity of the effects. This ensures that observed behavior effects are not driven by morphological effects since malformed embryos could show hypoactivity (Padilla et al., 2011). It is worthy to note that chemicals causing hyperactivity such as organophosphates, may induce hypoactivity at high concentrations in nondeformed embryos. This could be due to over-excitation of the neuron cell leading to axonal defects or paralysis and this does not necessarily lead to observable phenotypes (Behra et al., 2002; Stehr et al., 2006; Pina-Crespo et al., 2014). This biphasic response could be accounted for by testing an extensive concentration range covering both the hypoand hyperactivity effects.

4.1.8. Endpoint selective controls - chemicals known to reliably and consistently alter the endpoint at a mechanistic level

Abamectin and chlorpyrifos were identified as hypo- and hyperactivity controls respectively, while diuron and pyraclostrobin could represent suitable negative controls in the STC test. Abamectin consistently caused hypoactivity at an EC_{50} of 0.055 μ M. Hypoactivity effects (LOEC) were also found for abamectin by Raftery et al. (2014) [3.1 μ M], Raftery and Volz (2015) [0.25 μ M], Weichert et al. (2017) [0.72 μ M] and Vliet et al. (2017) [1.56 μ M]. The variation in hypoactivity effect concentrations for abamectin could be due to the use of hypothesis testing rather than dose-response modeling used in this study. Hyperactivity was also recorded for chlorpyrifos at an EC₅₀ of 1.85 μ M and this was consistent with the effects (LOEC) of Watson et al. (2014) [1 μ M] and Selderslaghs et al. (2010) [1.8 μ M]. The reproducibility of chlorpyrifos and abamectin, as demonstrated by comparing our studies to literature studies indicates the usability of these chemicals as positive controls in the STC test. However, a mechanistic level investigation is still required to verify how these chemicals alter the endpoint. Diuron did not induce any effect within the concentration range tested (1–8 μ M). However, diuron caused hypoactivity in another STC test at 16.3 μ M (Velki et al., 2017). This same concentration could not be assessed in the present study because it caused 100% lethality. Velki et al. (2017) did not only report hypoactivity at 16.3 μ M, but also incomplete tail coiling which could represent unspecific effects due to overt toxicity.

4.1.9. Training set of chemicals - proof-of-concept that the test method can rapidly and efficiently screen moderate numbers of chemicals

The STC test as devised in this study for MoA identification takes approximately 2 min for measuring a single glass dish. This means a single chemical with 5 concentrations and 2 replicates will last approximately 20 min. The required time can be reduced for rapid screening of chemicals in which lower number of concentrations and replicates are used. Furthermore, high resolution cameras and well plates can be applied in screenings to achieve a higher throughput. A total of 18 chemicals were tested in this study to evaluate the capability of the STC test to detect neuroactive substances. The chemicals were classified based on their known mode of action to be hyperactive, hypoactive and not-active. Hyperactive chemicals are expected to activate neuronal synapse while hypoactive ones are expected to inhibit neuronal signal transduction, thereby causing increase and decrease in the STC respectively. Seven of the exposed chemicals were expected to cause hyperactivity. The STC test detected hyperactivity for chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, paraoxon-methyl and diazinon with sensitivity ratios (LC₅₀/EC₅₀) of 2.9, 4.7, 55.7 and 3.7 respective to their 48 or 96 h LC50 (Table 1). The hyperactivity effect of these substances could be related to their proven capacity to inhibit acetylcholinesterase in zebrafish embryos (Kais et al., 2015; Küster, 2005; Yang et al., 2011; Yen et al., 2011). This was revealed in the fact that chlorpyrifos was about 6 times less toxic than chlorpyrifos-oxon which is the readily potent form to inhibit acetylcholinesterase. Additionally, chlorpyrifosoxon induced a biphasic effect i.e. hyperactivity at low concentrations and hypoactivity at higher concentration of 25 μ M which could be an indication of axonal deformation or over-excitation of nerve cells resulting in paralysis (Behra et al., 2002; Ogungbemi et al., 2019). Paraoxon-methyl also induced sublethal effects (incomplete tail coiling and reduced-resorption of yolk sac) at high concentration of 100 μ M which could be indications of developmental delay (SI Fig. S3). Teixidó et al. (2013) also found developmental delay (reduced head-trunk angle and tail length) for embryos exposed from 48–52 hpf to 20 μM paraoxon. Despite that hyperactivity has been reported for aldicarb (Kokel et al., 2010) and nicotine (Leuthold et al., 2019; Thomas et al., 2009) in short exposure behavior tests, both chemicals showed only a subtle and highly variable hyperactivity in the present study (Fig. 4). This may be attributed to low hydrophobicity (Log Kow of 1.2) which may lead to quick attainment of steady state (Kühnert et al., 2013) and hence a relatively long exposure of 24 h could lead to degradation/detoxification or a desensitization effect of these compounds. In particular, 30 µM nicotine was found to reach steady state in 10 min for 23 hpf embryos. This then desensitized the nicotinic acetylcholine receptors even after a 2 h depuration (Thomas et al., 2009). To further investigate this possible desensitization of nicotine, we conducted an additional short duration exposure (20 min) for nicotine. Similar to the study by Thomas et al. (2009), we found a clear hyperactivity for nicotine at different concentrations (10, 20, 30, 40 µM) which became minimal in a long duration exposure (SI Fig. S4). This result suggests short duration tests could be implemented as a second-tier or alongside long duration tests to improve the diagnostic capacity of the STC, especially for substances with fast uptake kinetics. Imidacloprid up to 2000 μ M did not induce effect in the STC test. Despite imidacloprid has been thought to be selective to insect nicotinic acetycholine receptors (nAChRs), some studies have reported effects of imidacloprid on locomotor activity of 5dpf zebrafish (Leuthold et al., 2019; Crosby et al., 2015). Absence of effect of imidacloprid in the present study may be due to specific effect of imidacloprid on the brain nAChRs rather than the neuromuscular receptors which the STC measures.

Hypoactivity was detected for all four chemicals; abamectin, carbamazepine, diazepam and propafenone with sensitivity ratios of 12.7, 0.97, 8.1 and 2.56 respective to their 48 h LC50 or baseline toxicity (Table 1). The hypoactivity effect of these substances could be related to their proven capacity to inhibit neuronal synapses by activating GABA gated chloride channels or blocking sodium channels (Söderpalm, 2002). Carbamazepine induced hypoactivity $(EC_{50} = 195 \,\mu\text{M})$ in Weichert et al. (2017) and this was only 1.4 fold lower than EC₅₀ of 271 µM obtained in the present study. Both values are in the same range as the 48 h LC_{50} (263 μ M) and this low sensitivity of the STC for carbamazepine could be due to similar issues related to low hydrophobicity and quick attainment of steady state as discussed for nicotine above (Halbach et al., 2020).

In search for non-active chemicals, we exposed 6 chemicals with unknown or no reported neuroactive mode of action. The ideal negative controls are chemicals that induce effect on other biological systems, but are not expected to disrupt the nervous system (Aschner et al., 2017). Birke and Scholz (2019) classified aniline and pyraclostrobin to be narcotic substances based on their toxic ratio (defined as the ratio of a chemical's LC₅₀ estimated from a QSAR for baseline toxicity and the experimental LC₅₀) value of 5.4 and 3.1 respectively. Other negative substances were selected based on unknown neurotoxic MoA. Only pyraclostrobin, daunorubicin-hydrochloride and diuron did not cause STC effect (SI Fig. S5). No STC effect for pyraclostrobin has already been reported up to 0.76 µM (Raftery et al., 2014). Interestingly, the STC test detected hyperactivity for hexaconazole, aniline and 3,4-dichloroaniline with sensitivity ratios of 16, 2.3 and 2.6 respectively to their 24 or 48 hpf LC₅₀ (Table 1). We consider hyperactivity to represent a specific effect on STC since unspecific secondary effects caused by cytotoxicity and/or malformation may rather result in hypoactivity. In fact, an hexaconazole containing product has been reported to cause neurotoxic effects such as trembling, jittering and shaking in a poisoned human (David et al., 2008) and hexaconazole is classified as neurotoxic to the human nervous system (Grandjean and Landrigan, 2014). Similar to our findings, hexaconazole also induced hyperactivity in the zebrafish embryo photomotor response test (Reif et al., 2016). Hexaconazole also decreased thyroxine (T4) levels while increasing triiodothyronine (T3) in 120 hpf zebrafish embryos (Yu et al., 2013). Hyperactivity effects of T3 and T4 on light/dark induced locomotor response of 120 hpf zebrafish embryo have also been reported (Walter et al., 2019). Subsequently, the hyperactivity induced in the STC test by hexaconazole may be associated to thyroid hormone disruption impacting the proper development of the motor neurons. An alternative hypothesis is hexaconazole may induce hyperactivity by blocking GABA receptors similar to its structurally related pentylenetetrazole (Squires et al., 1984). Aniline is classified as neurotoxic in the pesticide properties database and tremor manifestations were associated to aniline exposure (National Research Council, 2008). Interestingly, a commonly used solvent, DMSO, also induced hyperactivity in the STC test despite that it has been listed as a potential negative control for developmental neurotoxicity (Aschner et al., 2017). Following from these results, we can consider the STC test valuable to indicate indirect effects on the nervous system.

4.1.10. Specificity and sensitivity - analysis to determine ability to correctly differentiate active and non-active chemicals

The STC test was able to accurately detect 8 out of 11 neuroactive substances, amounting to 73% sensitivity. However, the results from

this study are too few to reliably estimate specificity and sensitivity. Moreover, it is difficult to estimate the specificity of the test because substances which do not have a known neuroactive mode of action may have unknown or indirect neuroactive side-effects like in the case of hexaconazole or aniline. Similarly, chemicals which show neurotoxic effect may induce this via non neural organs or receptors.

4.1.11. High throughput - test system and endpoint should be amenable to automation $% \left(f_{1}, f_{2}, f_{3}, f_$

The STC test can be considered to be a mid-high throughput test because of its short test duration of 24 h compared to other behavior tests, short video acquisition duration and possible automated workflows for estimating the STC frequency. It may be further optimized to comply with analysis in 96well plates which could further improve throughput. However, utilizing plastic 96well plates may compromise effect concentrations due to sorption of lipophilic compounds to plastic wells.

4.1.12. Documentation - full and published documentation of the test method resources

Full documentation of the STC test as used in the current study can be found within the <u>Materials and method</u> section and within the complementary method paper associated to this study.

4.1.13. Transferability - resources for use should be available for any laboratory

The required resources for easy implementation of the STC test are accessible and widely available. The test organism, zebrafish, is a model organism and can be easily reared in indoor aquaria. Moreover, the eggs obtained from the adults can be synchronized by cell stage. The glass crystallization exposure dish can be readily purchased. The assessment tools; microscope and camera are regularly used resources in most biology laboratories and can be easily purchased and set up. Most especially, we provide a workflow for automated STC counting within the KNIME* platform. This workflow is freely available by searching for "spontaneous tail coilings detection in zebrafish" on https://hub.knime.com/ and can be easily implemented by following basic instructions outlined in the associated method paper or by watching this video - https://youtu.be/wgJN71zTvRw. This means that laboratories that cannot afford commercially available software can still maximize the capacity of the STC test.

5. Conclusion

In this study, we optimized the STC test and investigated the effect of 18 chemicals with different MoA. We show that developmental stage and analysis duration can influence the STC response. Based on this, we selected 24-25 hpf and 1 min as the optimal developmental stage and analysis duration for testing. Other parameters such as acclimation duration (within 30 min), sample size and rearing conditions had no observable impact. Consequently, we selected a sample size of 20 embryos, group rearing condition and acclimatized the sample at room temperature for 30 min before analysis. Apart from a MATLAB® tool (González-Fraga et al., 2019) which still requires a paid version of MATLAB®, our KNIME® workflow is the only available freeware for STC analysis. The optimized STC test showed high sensitivity by detecting 8 out of 11 neuroactive substances at concentrations below their acute or baseline lethality. Interestingly, the STC test could also detect effects for substances with unknown neuroactive MoA which indicates possible neuroactive side effects or unknown mechanisms of action that impact on the STC. Two of the chemicals tested in this study (chlorpyrifos and nicotine) are classified as reference compounds for developmental neurotoxicity (Aschner et al., 2017). In conclusion, we show the high potential of the STC test to screen developmental neurotoxicity for hazard assessment and for effect-based environmental monitoring. Therefore, a desired next step will be to harmonize and validate the STC test for prospective and diagnostic testing.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106918.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

Firstly, we would like to acknowledge the high-spirited patronage by the late Dr. Tamara Grummt throughout the whole project! We also want to acknowledge the financial support for AO. Ogungbemi and R. Massei by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the Neurobox Project (FKZ 02WRS1419F). In addition parts of the study were co-financed by the UFZ integrated project Exposome. Parts of this study were presented at the conference for fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology 2018. Lastly, we highly acknowledge the help by Nicole Schweiger for fish culture and embryo production.

References

- Aschner, M., Ceccatelli, S., Daneshian, M., Fritsche, E., Hasiwa, N., Hartung, T., Hogberg, H.T., Leist, M., Li, A., Mundy, W.R., Padilla, S., 2017. Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use. Altex 34 (1), 49. https://doi.org/10.14573/altex.1604201.
- Bal-Price, A., Crofton, K.M., Leist, M., Allen, S., Arand, M., Buetler, T., Delrue, N., FitzGerald, R.E., Hartung, T., Heinonen, T., Hogberg, H., 2015. International STakeholder NETwork (ISTNET): creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes. Arch. Toxicol. 89, 269–287. https://doi. org/10.1007/s00204-015-1464-2.
- Basnet, R.M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., Memo, M., 2019. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. Biomedicines 7 (1), 23. https://doi.org/10. 3390/biomedicines7010023.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. Nat. Neurosci. 5 (2), 111–118. https://doi.org/10.1038/ nn788.
- Berthold, M.R., Cebron, N., Dill, F., Gabriel, T.R., Kötter, T., Meinl, T., Ohl, P., Thiel, K., Wiswedel, B., 2009. KNIME-the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond. AcM SIGKDD explorations Newsletter 11 (1), 26–31. https://doi.org/10.1145/ 1656274.1656280.
- Birke, A., Scholz, S., 2019. Zebrafish embryo and acute fish toxicity test show similar sensitivity for narcotic compounds. ALTEX-Alternatives to animal experimentation 36 (1), 131–135. https://doi.org/10.14573/altex.1808101.
- Bittner, L., Teixidó, E., Keddi, I., Escher, B.I., Klüver, N., 2019. pH-dependent uptake and sublethal effects of antihistamines in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ. Toxicol. Chem. 38 (5), 1012–1022. https://doi.org/10.1002/etc.4395.
- Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., 2005. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX-Alternatives to animal experimentation 22 (2), 87–102. https://www.altex.org/ index.php/altex/article/view/911.
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: a mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. Environ. Toxicol. Chem. 35 (8), 1887–1899. https://doi.org/10.1002/etc.3460.
- Chen, Y.H., Huang, F.L., Cheng, Y.C., Wu, C.J., Yang, C.N., Tsay, H.J., 2008. Knockdown of zebrafish Na v 1.6 sodium channel impairs embryonic locomotor activities. J. Biomed. Sci. 15 (1), 69–78. https://doi.org/10.1007/s11373-007-9200-4.
- Chen, X., Huang, C., Wang, X., Chen, J., Bai, C., Chen, Y., Chen, X., Dong, Q., Yang, D., 2012. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. Aquat. Toxicol. 120, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.014.
- Cheng, R., Jia, Y., Dai, L., Liu, C., Wang, J., Li, G., Yu, L., 2017. Tris (1, 3-dichloro-2propyl) phosphate disrupts axonal growth, cholinergic system and motor behavior in early life zebrafish. Aquat. Toxicol. 192, 7–15. https://doi.org/10.1016/j.aquatox. 2017.09.003.
- Crofton, K.M., Mundy, W.R., Lein, P.J., Bal-Price, A., Coecke, S., Seiler, A.E., Knaut, H., Buzanska, L., Goldberg, A., 2011. Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. ALTEX-Alternatives to animal experimentation 28 (1), 9–15. https://doi.org/10.14573/altex.2011.1.009.
- Crosby, E.B., Bailey, J.M., Oliveri, A.N., Levin, E.D., 2015. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. Neurotoxicol. Teratol.

49, 81-90. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006.

- David, D., Prabhakar, A., Peter, J.V., Pichamuthu, K., 2008. Human poisoning with hexastarTM: a hexaconazole-containing agrochemical fungicide. Clin. Toxicol. 46 (7), 692–693. https://doi.org/10.1080/15563650701447012.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. Prog. Neurobiol. 68 (2), 85–111. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8.
- González-Fraga, J., Dipp-Alvarez, V., Bardullas, U., 2019. Quantification of spontaneous tail movement in zebrafish embryos using a novel open-source MATLAB application. Zebrafish 16 (2), 214–216. https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1688.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J., 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. The lancet neurology 13 (3), 330–338. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13) 70278-3.
- Grunwald, D.J., Kimmel, C.B., Westerfield, M., Walker, C., Streisinger, G., 1988. A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. Dev. Biol. 126 (1), 115–128. https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90245-X.
- Halbach, K., Ulrich, N., Goss, K.U., Seiwert, B., Wagner, S., Scholz, S., Luckenbach, T., Bauer, C., Schweiger, N., Reemtsma, T., 2020. The yolk sac of zebrafish embryos as backpack for chemicals? Environmental Science & Technology. https://doi.org/10. 1021/acs.est.0c02068. (in press).
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol. Sci. 86 (1), 6–19. https://doi.org/ 10.1093/toxsci/kfi110.
- ISO (International Standards Organization), 1996. Water quality determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — part 3: flow-through method. ISO 7346-3. https://www.iso.org/standard/14030.html.
- Kais, B., Stengel, D., Batel, A., Braunbeck, T., 2015. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (21), 16329–16339. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4460-4.
- Kimmel, C.B., Patterson, J., Kimmel, R.O., 1974. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology 7 (1), 47–60. https://doi.org/10.1002/dev.420070109.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203 (3), 253–310. https://doi. org/10.1002/aja.1002030302.
- Klüver, N., König, M., Ortmann, J., Massei, R., Paschke, A., Kühne, R., Scholz, S., 2015. Fish embryo toxicity test: identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. Environmental science & technology 49 (11), 7002–7011. https://doi. org/10.1021/acs.est.5b01910.
- Klüver, N., Vogs, C., Altenburger, R., Escher, B.I., Scholz, S., 2016. Development of a general baseline toxicity QSAR model for the fish embryo acute toxicity test. Chemosphere 164, 164–173. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.079.
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C.Y.J., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A.A., Haggarty, S.J., MacRae, C.A., 2010. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. Nat. Chem. Biol. 6 (3), 231–237. https://doi.org/10.1038/nchembio.307.
- Kühnert, A., Vogs, C., Altenburger, R., Küster, E., 2013. The internal concentration of organic substances in fish embryos—a toxicokinetic approach. Environ. Toxicol. Chem. 32 (8), 1819–1827. https://doi.org/10.1002/etc.2239.
- Küster, E., 2005. Cholin-and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (Danio rerio) and their potential use for insecticide hazard assessment. Aquat. Toxicol. 75 (1), 76–85. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.07.005.
- Legradi, J., El Abdellaoui, N., Van Pomeren, M., Legler, J., 2015. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (21), 16277–16289. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3805-8.
- Leuthold, D., Klüver, N., Altenburger, R., Busch, W., 2019. Can environmentally relevant neuroactive chemicals specifically be detected with the locomotor response test in zebrafish embryos? Environmental science & technology 53 (1), 482–493. https:// doi.org/10.1021/acs.est.8b04327.
- Massei, R., Vogs, C., Renner, P., Altenburger, R., Scholz, S., 2015. Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (Danio rerio): the role of toxicokinetics for stagespecific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. Aquat. Toxicol. 166, 36–41. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.011.
- National Research Council, 2008. Aniline acute exposure guideline levels. Committee on Acute Exposure Guideline Levels. In: Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals. vol. 6 National Academies Press (US), Washington (DC) Available from. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK207869/.
- OECD, 2007a. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study. https://doi.org/10. 1787/9789264067394-en.
- OECD, 2007b. Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents. https://doi.org/10.1787/ 9789264071025-en.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Toxicity Test (FET). https://doi.org/10.1787/ 9789264203709-en.
- Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., Küster, E., 2019. Hypo-or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes. Environ. Sci. Eur. 31 (1), 88. https://doi.org/10.1186/s12302-019-0270-5.
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: influence of extrinsic and intrinsic variables.
- Neurotoxicol. Teratol. 33 (6), 624–630. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005. Parker, M.O., 2016. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: reliability and validity. Aquat. Toxicol. 170, 323–329. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09. 001.

- Raftery, T.D., Volz, D.C., 2015. Abamectin induces rapid and reversible hypoactivity within early zebrafish embryos. Neurotoxicol. Teratol. 49, 10–18. https://doi.org/10. 1016/j.ntt.2015.02.006.
- Pina-Crespo, J.C., Sanz-Blasco, S., Lipton, S.A., 2014. Concept of excitotoxicity via glutamate receptors. *Handbook of neurotoxicity*. Springer, pp. 1015–1038. https://doi. org/10.1007/978-1-4614-5836-4_125.
- Raftery, T.D., Isales, G.M., Yozzo, K.L., Volz, D.C., 2014. High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. Environmental science & technology 48 (1), 804–810. https://doi.org/10.1021/ es404322p.
- Reif, D.M., Truong, L., Mandrell, D., Marvel, S., Zhang, G., Tanguay, R.L., 2016. Highthroughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes. Arch. Toxicol. 90 (6), 1459–1470. https://doi.org/10. 1007/s00204-015-1554-1.
- Richendrfer, H., Creton, R., Colwill, R.M., 2014. The embryonic zebrafish as a model system to study the effects of environmental toxicants on behavior. In: Lessman, C., Carver, E. (Eds.), Zebrafish. ©Nova Science Publishers, New York, 978-1-63117-558-9, pp. 245–264.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. J. Stat. Softw. 12 (5), 1–22. https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. J. Neurobiol. 37 (4), 622–632. https://doi.org/10.1002/(SICI) 1097-4695(199812)37:4%3C622::AID-NEU10%3E3.0.CO;2-S.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 2000. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. J. Neurosci. 20 (11), 3964–3972. https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.20-11-03964.2000.
- Scholz, S., Sela, E., Blaha, L., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., García-Franco, M., Guinea, J., Klüver, N., Schirmer, K., Tanneberger, K., Tobor-Kapłon, M., 2013. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 67 (3), 506–530. https://doi.org/10. 1016/j.yrtph.2013.10.003.
- Selderslaghs, I.W., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol. 32 (4), 460–471. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.002.
- Sobanska, M., Scholz, S., Nyman, A.M., Cesnaitis, R., Gutierrez Alonso, S., Klüver, N., Kühne, R., Tyle, H., de Knecht, J., Dang, Z., Lundbergh, I., 2018. Applicability of the fish embryo acute toxicity (FET) test (OECD 236) in the regulatory context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). Environ. Toxicol. Chem. 37 (3), 657–670. https://doi.org/10.1002/etc.4055.
- Söderpalm, B., 2002. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. Eur. J. Pain 6 (SA), 3–9. https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0315.
- Squires, R.F., Saederup, E., Crawley, J.N., Skolnick, P., Paul, S.M., 1984. Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/ picrotoxin receptor complexes in brain. Life Sci. 35 (14), 1439–1444. https://doi. org/10.1016/0024-3205(84)90159-0.
- Stehr, C.M., Linbo, T.L., Incardona, J.P., Scholz, N.L., 2006. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. Toxicol. Sci. 92 (1), 270–278. https://doi.org/10.1093/toxsci/ kfj185.
- Teixidó, E., Piqué, E., Gómez-Catalán, J., Llobet, J.M., 2013. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. Toxicol. in Vitro 27 (1), 469–478. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.07.010.
- Thomas, L.T., Welsh, L., Galvez, F., Svoboda, K.R., 2009. Acute nicotine exposure and modulation of a spinal motor circuit in embryonic zebrafish. Toxicol. Appl. Pharmacol. 239 (1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.08.023.
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1812 (3), 381–389. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011.
- Tufi, S., Leonards, P., Lamoree, M., de Boer, J., Legler, J., Legradi, J., 2016. Changes in neurotransmitter profiles during early zebrafish (Danio rerio) development and after pesticide exposure. Environmental science & technology 50 (6), 3222–3230. https:// doi.org/10.1021/acs.est.5b05665.
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. Chemosphere 180, 65–76. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.017.
- Vliet, S.M., Ho, T.C., Volz, D.C., 2017. Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos. Toxicol. Appl. Pharmacol. 329, 241–248. https://doi.org/10. 1016/j.taap.2017.06.011.
- Walter, K.M., Miller, G.W., Chen, X., Harvey, D.J., Puschner, B., Lein, P.J., 2019. Changes in thyroid hormone activity disrupt photomotor behavior of larval zebrafish. NeuroToxicology 74, 47–57. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.05.008.
- Watson, F.L., Schmidt, H., Turman, Z.K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman, J., Fradinger, E.A., 2014. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in Danio rerio and Xenopus laevis. Environ. Toxicol. Chem. 33 (6), 1337–1345. https://doi.org/10.1002/etc. 2559.
- Weichert, F.G., Floeter, C., Artmann, A.S.M., Kammann, U., 2017. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances–evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of Danio rerio. Chemosphere 186, 43–50. https://doi.org/10. 1016/j.chemosphere.2017.07.136.
- Yang, D., Lauridsen, H., Buels, K., Chi, L.H., La Du, J., Bruun, D.A., Olson, J.R., Tanguay, R.L., Lein, P.J., 2011. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. Toxicol. Sci. 121 (1), 146–159. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr028.
- Yen, J., Donerly, S., Levin, E.D., Linney, E.A., 2011. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. Neurotoxicol. Teratol. 33 (6), 735–741. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.10.004.

- Yozzo, K.L., McGee, S.P., Volz, D.C., 2013. Adverse outcome pathways during zebrafish embryogenesis: a case study with paraoxon. Aquat. Toxicol. 126, 346–354. https:// doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.008.
- Yu, L., Chen, M., Liu, Y., Gui, W., Zhu, G., 2013. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. Aquat. Toxicol. 138, 35–42. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.001.

Zellner, D., Padnos, B., Hunter, D.L., MacPhail, R.C., Padilla, S., 2011. Rearing conditions

differentially affect the locomotor behavior of larval zebrafish, but not their response to valproate-induced developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol. 33 (6), 674–679. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.06.007.

Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T., 2019. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (Danio rerio) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. Ecotoxicol. Environ. Saf. 186, 109754. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109754.



Article



Assessing Combined Effects for Mixtures of Similar and Dissimilar Acting Neuroactive Substances on Zebrafish Embryo Movement

Afolarin O. Ogungbemi^{1,2,*}, Riccardo Massei³, Rolf Altenburger¹, Stefan Scholz¹ and Eberhard Küster¹

- ¹ Department of Bioanalytical Ecotoxicology, UFZ—Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany; rolf.altenburger@ufz.de (R.A.); stefan.scholz@ufz.de (S.S.); eberhard.kuester@ufz.de (E.K.)
- ² Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, Fortstraße 7, 76829 Landau, Germany
 ³ Department of Effect-Directed Analysis, UFZ—Helmholtz Centre for Environmental Research,
- Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany; riccardo.massei@ufz.de
- * Correspondence: afolarin.ogungbemi@ufz.de

Abstract: Risk assessment of chemicals is usually conducted for individual chemicals whereas mixtures of chemicals occur in the environment. Considering that neuroactive chemicals are a group of contaminants that dominate the environment, it is then imperative to understand the combined effects of mixtures. The commonly used models to predict mixture effects, namely concentration addition (CA) and independent action (IA), are thought to be suitable for mixtures of similarly or dissimilarly acting components, respectively. For mixture toxicity prediction, one important challenge is to clarify whether to group neuroactive substances based on similar mechanisms of action, e.g., same molecular target or rather similar toxicological response, e.g., hyper- or hypoactivity (effect direction). We addressed this by using the spontaneous tail coiling (STC) of zebrafish embryos, which represents the earliest observable motor activity in the developing neural network, as a model to elucidate the link between the mechanism of action and toxicological response. Our objective was to answer the following two questions: (1) Can the mixture models CA or IA be used to predict combined effects for neuroactive chemical mixtures when the components share a similar mode of action (i.e., hyper- or hypoactivity) but show different mechanism of action? (2) Will a mixture of chemicals where the components show opposing effect directions result in an antagonistic combined effect? Results indicate that mixture toxicity of chemicals such as propafenone and abamectin as well as chlorpyrifos and hexaconazole that are known to show different mechanisms of action but similar effect directions were predictable using CA and IA models. This could be interpreted with the convergence of effects on the neural level leading to either a collective activation or inhibition of synapses. We also found antagonistic effects for mixtures containing substances with opposing effect direction. Finally, we discuss how the STC may be used to amend risk assessment.

Keywords: mixture toxicity; neurotoxicity; antagonism; organophosphate; acetylcholinesterase inhibitors; GABA; behavior; risk assessment; spontaneous movement activity

1. Introduction

Chemicals typically occur as mixtures in the environment and hence, organisms are exposed to a combination of these chemicals. However, prospective risk assessment is conducted for single chemicals and may not account for combined effects [1]. Since it is practically impossible to test all the possible combinations of chemical exposure, modeling of mixture toxicity allows one to at least predict an expected effect of several chemicals from their individual effects.

Two common mixture toxicity models are concentration addition (CA) and independent action (IA). CA is based on the notion that mixture toxicity can be predicted by the



Citation: Ogungbemi, A.O.; Massei, R.; Altenburger, R.; Scholz, S.; Küster, E. Assessing Combined Effects for Mixtures of Similar and Dissimilar Acting Neuroactive Substances on Zebrafish Embryo Movement. *Toxics* **2021**, *9*, 104. https://doi.org/ 10.3390/toxics9050104

Academic Editors: Demetrio Raldúa, Carlos Barata and Melissa Faria

Received: 29 March 2021 Accepted: 28 April 2021 Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). addition of the fractions of exposure and effect concentrations for the mixture components. In addition, the single components of the mixture should cause a similar effect or target a similar receptor in the organism [2]. On the other hand, IA may be applied when compounds are acting independently [3] which has been interpreted as acting on different target sites in the organism [4]. Both models have been found to be reasonably predictive in several studies exposing unicellular organisms to bioactive compounds with known mechanisms of action [5–7]. Nevertheless, these models cannot predict the interaction of chemicals at the physical, toxicokinetic or toxicodynamic level [8]. In this case, CA and IA models may be used to evaluate observations as antagonistic (less effect than predicted) or synergistic (higher effect than predicted) and to quantify such deviations.

Neuroactive chemicals are often found in insecticidal and pharmaceutical products in which they represent active ingredients designed to interact with specific targets and receptors of the nervous system. Busch et al. [9] found that neuroactive substances are the largest group (13%) of chemicals detected in European surface waters. Despite neuroactive substances being often detected in the environment, only a few studies have explored how neuroactive substances act in mixtures to induce combined neurotoxicity (e.g., Corbel et al. [10]; Yang et al. [11]) and how to use the mode of action knowledge to group them for mixture effect prediction using CA and IA models.

Zebrafish embryos are considered as an alternative model to animal testing since they are considered to feel less pain or distress [12]. Due to behavioral patterns already established in embryonic stages, embryos are also frequently used as a model for neurotoxicity assessment. Several behavioral test methods have been developed such as spontaneous tail coiling (STC), photomotor response (PMR) and locomotor response (LMR) (reviewed in Ogungbemi et al. [13]). Despite the potential of non-lethal endpoints such as behavior for ecotoxicology research, the applicability of CA and IA models to such endpoints for mixture effect prediction is not well studied. Hence, it is valuable to investigate the applicability of CA and IA models for such experimental systems to predict and understand how mixtures of neuroactive substances may act in the environment. To implement mixture models, bioassays capable of quantitatively detecting impact on the nervous system are required. In this study we explored the spontaneous tail coiling (STC) of zebrafish embryos, one frequently used assay for assessing neuroactivity. STC represents the earliest motor activity observed in developing zebrafish embryos. It is the result of the innervation of the muscles by the primary motor neurons and can be observed beginning at 17 hours post-fertilization (hpf) [14,15]. Measurement of the STC frequency has been proposed as an indicator of adverse effects on the function and development of the nervous system which could lead to population and ecosystem effects [13,16]. Consequently, the STC has been used to study the effects of diverse neuroactive chemicals [17–20]. Until now the STC has not been used as a test method to measure mixture neurotoxicity based on a chemical's mode or mechanism of action. In this study, we define the mechanism of action as the interaction of neuroactive chemicals with specific molecular targets such as acetylcholinesterase (AChE) and gamma aminobutyric acid (GABA) activated ion channels. On the other hand, mode of action is defined here as the series of key events (including the mechanism of action) in the nervous system leading to a measurable toxicological response such as hyper- or hypoactivity behavior phenotypes (referred to as effect direction onwards). Hypoactivity refers to a decrease in the STC frequency, while hyperactivity refers to the increase with respect to the level in non-exposed embryos.

The STC test has been shown to discriminate movement activity changes due to exposure to chemicals with different modes of action causing either hyper- or hypoactivity but not those with different mechanisms of action [13,17]. Based on previous results in Ogungbemi et al. [13,17], we postulate the STC neuroactivity hypothesis which states that a neuroactive substance will induce increased STC (hyperactivity) in zebrafish embryos if its mechanism of action directly or indirectly leads to activation of the neuronal synapse and vice versa for hypoactivity. For example, different mechanisms of action such as AChE inhibition and GABA antagonism may both enhance neuronal activation potential in the

neuromuscular synapses by inducing the inflow of sodium ions and blocking the inflow of chloride ions respectively [21]. Both mechanisms are expected to cause hyperactivity response regardless of the different target receptors. Similarly, compounds activating GABA receptors or blocking sodium channels may cause hypoactivity by enhancing the inhibitory synapses [22].

Based on such prior knowledge about the link between the mechanism of action and toxicological response, we defined two levels of similarity for our mixture toxicity expectation: (1) The mixture components are known to have similar target receptors or mechanism of action and (2) they show similar toxicological response (i.e., effect direction: hyper- or hypoactivity) in the STC test. Therefore, we selected mixture components based on the above factors. Compounds expected to induce hyperactivity were chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon and hexaconazole while abamectin, carbamazepine and propafenone are anticipated to induce hypoactivity in the STC test.

The link between effect direction and mechanism of action has been shown for single substances. In contrast, it is still open if this also works for mixture components with similar or dissimilar mechanisms of action. Therefore, the goal of the present study is to address the following questions: (1) Can the additivity models CA or IA be used to predict combined effects for neuroactive chemical mixtures when the components share a similar mode of action (hyper- or hypoativity) but show different mechanism of action? (2) Will a mixture of chemicals where the components show opposing effect direction result in an antagonistic combined effect? CA or IA cannot be used to predict the opposing effects and therefore we define antagonistic effect in this case as a counteracting effect and not a lower effect than predicted by CA or IA. We demonstrate that mixtures of neuroactive substances with different mechanisms of action follow the additivity concept and we propose ways to use the STC test in risk assessment.

2. Materials and Methods

2.1. Test Organism

Zebrafish embryos were raised from an in-house hybrid strain (OBI-WIK strain, F3 generation). The adults were cultured under 14 h light/10 h dark photoperiod in 120 L aquaria (tap water, 26.5 ± 1 °C). Adult fish were fed twice a day either with commercial dry food flakes or *Artemia* sp. and physicochemical parameters of the aquaria water were frequently measured (pH 7–8; water hardness 2–3 mmol/L, conductivity 540–560 µS/cm, nitrate < 2.5 mg/L, nitrite < 0.025 mg/L, ammonia < 0.6 mg/L, oxygen saturation 87–91%). Spawning was initiated by inserting spawning trays 4–6 h before the end of the light cycle prior to the spawning day. Eggs were collected and cleaned 1 h after the onset of light. Fertilized embryos were selected according to Kimmel et al. [23] with a microscope and embryos between the 16th and 128th cell stage were used to start the exposure.

2.2. Chemicals

Chlorpyrifos (99.9%, CASRN 2921882), hexaconazole (CASRN 79983-71-4), abamectin (100%, CASRN 71751412) and propafenone-hydrochloride (CASRN 34183-22-7) were purchased from Sigma-Aldrich. Carbamazepine (99%, CASRN 298464) was purchased from Acros OrganicTM and chlorpyrifos-oxon (97.9%, CASRN 5598152) from Dr. Ehrenstorfer GmbH. Stock solutions were prepared in 100% dimethyl-sulfoxide (DMSO) and diluted in ISO water as specified in ISO 7346-3 (1996) (80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MgSO₄·7H₂O, 31 mM NaHCO₃, 3.1 mM KCl). The properties, effect concentrations and model parameters for single substances used in mixture modeling are given in Table 1.

Substance	Chemical Class	Mechanism of Action ^a	Expected Activity, i.e., Effect Direction	STC <i>EC</i> ₅₀ (µmol/L) ^b	Slope of crc ^b
Chlorpyrifos	Organophosphate	Acetylcholinesterase inhibitor *	Hyperactivity	1.85 (1.95)	1.30
Chlorpyrifos-oxon	Organophosphate	Acetylcholinesterase inhibitor *	Hyperactivity	0.32 (0.44)	1
Hexaconazole	Triconazole	Ergosterol biosynthesis inhibitor *	Hyperactivity	4.03 (3.63)	1.80
Abamectin	Avermectin	Activation of GABA-gated chloride channel ^{\$}	Hypoactivity	0.06 (0.09)	1.70
Carbamazepine	Dibenzazepine	Sodium channel blocker [#]	Hypoactivity	271	2.28
Propafenone	Aromatic Ketone	Sodium channel blocker [#]	Hypoactivity	32 (46)	1.94

Table 1. Properties and effects of single substances in the spontaneous tail coiling (STC) test.

^a Mechanism of action was obtained from different sources including [#] http://drugbank.com * pesticide properties database (https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/index.htm) and ^{\$} Sánchez-Bayo, (2012) [24]; ^b Data obtained from Ogungbemi et al., (2020), the minimum and maximum of the concentration–response curves (crc) were set to 0 and 100, respectively. Values in parenthesis were obtained from independent experiments and were used for the mixture modelling.

2.3. Mixture Testing in the STC Test

Several mixtures were designed to investigate the appropriate classification for similar and dissimilar neuroactive substances which is suitable for mixture effect prediction using CA or IA models. Mixture components were selected according to their mechanism of action and effect direction (hyper- or hypoactivity) as follows (Figure 1 and Table 2): Mixture A—compounds with the same mechanism of action and same effect direction; Mixture B-compounds with different mechanism of action but same effect direction; Mixture C—compounds in A and B; Mixture D—compounds with a different mechanism of action and different effect direction. Mixtures A and B are binary while C and D are ternary. The exposure concentrations of the mixtures given in Table 2 are based on mixture ratios of the single substances calculated as molar fraction of their effect concentrations (EC_{50}) . The EC_{50} concentration was selected to ensure that all components in the mixture contribute to the effect. Mixture D was particularly designed to understand if and how dissimilar compounds with different mechanisms of action and opposing effect direction would interact in the STC test. Although components of mixture D are equitoxic (in terms of EC_{50} ratio), the mixture was designed to reflect an unequitoxic scenario with respect to effect direction (0.33 hypoactivity: 0.66 hyperactivity).



Figure 1. Mixture design scheme representing the hypotheses of this study. The letters A, B, C and D represent the mixture design according to Table 2. Each equation scheme for mixtures A, B and C represents a hypothesis whether concentration addition (CA) or independent action (IA) models could predict the hyper- or hypoactivity effects expected for mixtures with similar and dissimilar mechanisms of action. Equation for mixture D represents an antagonistic effect hypothesis.

					Des dista d E	C (
Mixture	Substances	Observed	Mixture	Exposure Concentration	Fredicted EC_{50} (µmol/L)		Observed
		Activity	Ratio ^a	(µmol/L) ^b	CA	IA	EC_{50} (µmol/L)
Mixture A	Chlorpyrifos and chlorpyrifos- oxon	Hyperactivity	0.816:0.184	0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 5 0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5	1.19	1.16	1.25
ivitAtuite II	Carbamazepine and propafenone	Hypoactivity	0.86:0.14	0, 40, 80, 160, 320 0, 78, 125, 200, 320	159	207	132
Mixture B	Hexaconazole and chlorpyrifos	Hyperactivity	0.65:0.35	0, 0.94, 1.87, 3.75, 7.5, 15 0, 0.75, 1.5, 3, 5.73, 12 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10	2.79	3.69	2.79
	Abamectin and propafenone	Hypoactivity	0.002:0.998	0, 2.8, 5.6, 11.3, 22.5, 45 0, 4.38, 8.75, 17.5, 35, 70	23	27.6	17.4
Mixture C	Chlorpyrifos, hexaconazole and chlorpyrifos- oxon	Hyperactivity	0.603:0.324 :0.073	0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 0, 0.33, 1, 3, 9	2	2.19	1.95
Mixture D	Chlorpyrifos, hexaconazole and abamectin	Hyper and Hypoactivity	0.34:0.64 :0.02	0, 1.25, 2.5, 5 0, 1, 2, 4	_ *	-	-
Simulation of Hyperactive Mixture A	Chlorpyrifos- oxon, (chlorpyrifos and hexaconazole)	Hyperactivity	0.184:(0.286 :0.53)	0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7	-	-	-

	Table 2. Summary	v of the mixture of	design, observed	toxicity and	predicted t	oxicit
--	------------------	---------------------	------------------	--------------	-------------	--------

* no mixture and toxicity predictions; ^a Mixture ratios are calculated as molar fraction of the total concentration. The ratio in the mixture is defined by the ratio of EC_{50} s. ^b The given exposure concentrations refer to the exposure range of independent experiments. In subsequent experiments, often different ranges were used to promote a better description of concentration–response curves. All concentration ranges were combined for concentration–response modelling.

0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10

0, 0.33, 1, 3, 9

0.65:(0.286

:0.064)

Hperactivity

Hexaconazole,

(chlorpyrifos and

chlorpyrifos-

oxon)

Simulation of

Hyperactive

Mixture B

To test if the simple case assumption of CA, i.e., substances are a dilution of each other and an equitoxic concentration of one can replace another [5], holds true for combined neurotoxicity effects in the STC test, we performed dilution experiments with the ternary mixture to simulate the hyperactivity mixtures A and B (chlorpyrifos and chlorpyrifosoxon as well as chlorpyrifos and hexaconazole respectively). A portion of chlorpyrifos was replaced with an EC_{50} equitoxic portion of hexaconazole in mixture A and chlorpyrifosoxon in mixture B (Table 2).

The detailed procedures for STC testing have been previously reported in detail [25]. Briefly, twenty fertilized embryos were exposed in 20 mL of the mixture solution prepared from DMSO stock solution (0.1% maximum concentration) of the components, within a 60 mm glass crystallization dish covered with a watchmaker glass. Two replicates per concentration and at least 2 independent experiments were conducted. The exposed embryos were incubated at 28 °C under 14 h light/10 h dark photoperiod for 21 ± 1 h. On the next day, at 24 hpf, exposed embryos were removed from the incubator and allowed to acclimatize to room temperature for at least 30 min. Videos of normally developed embryos (without any obvious malformation) were recorded for 60 s. Collected videos were analyzed for STC counts per minute (STC frequency) by means of a workflow using the KNIME[®] Analytical Platform [25,26].

2.4. Mixture Modeling

Mixture toxicity modeling was performed to investigate the capacity of concentration addition (CA) and independent action (IA) models to predict the combined effect of similar and dissimilar neuroactive substances. Effect data for the single substances used for mixture modelling were obtained from a previous study [17]. The CA mixture modeling is based on the effect concentration of the individual chemicals and it considers chemicals in a mixture to be a dilution of each other [5]. It is used to predict the mixture toxicity of chemicals with a similar mechanism of action.

$$ECx_{Mix} = \sum_{i=1}^{n} \frac{P_i^{-1}}{ECx_i} \tag{1}$$

Equation (1) shows the mathematical representation of the CA model where ECx_{Mix} is the total concentration of the mixture provoking *x* effect (i.e., 50% effect), P_i is the fraction of component *i* which represents the concentration of component *i* in the mixture, ECx_i is the concentration of component *i* provoking *x* effect, when applied singly.

The IA mixture modeling is based on the effect induced by individual chemicals in a mixture. It is usually applied to predict the mixture toxicity of chemicals with the dissimilar mechanism of action.

$$EC_{Mix} = 1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - EC_i)$$
 (2)

Equation (2) shows the mathematical representation of the IA model where EC_{Mix} is the total effect of the mixture and EC_i is the effect of component i in the mixture when applied singly. Mixture toxicity modeling was performed using an in-house excel sheet and the mixtox package in R [27].

2.5. Concentration–Response Modeling

Data from the mixture experiment were obtained as STC count per minute (STC frequency). The mean STC frequency was estimated for the exposed 20 embryos. The absolute STC frequency varied between the independent experiments. To combine results from independent experiments, mean percentage change in STC frequency with respect to unexposed embryos was estimated for independent experiments. Concentration–response

modeling of the percentage change in STC frequency was performed using the 4-parameter logistic function (LL.4) of the drc package in R [28].

$$y = c + \frac{(d-c)}{1 + \left(\frac{x}{\rho}\right)^b} \tag{3}$$

Equation (3) shows the concentration (x) response (y) model where b is the slope; c and d are the minimum and maximum STC response set to 0 and 100, respectively; and e is the inflection point, e.g., the EC_{50} .

In cases of hyperactivity, the maximum effect of STC frequency was different for the three tested hyperactive chemicals-chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon and hexaconazole (see Figure 2). Mixture prediction using different maximal of the percentage STC effect would have been based on a non-equitoxic mixture ratio of EC_{50} , EC_{41} and EC_{24} for hexaconazole, chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon respectively. To equalize the mixture ratio and maximum effect, the percentage STC change (obtained by normalizing to control) was standardized by dividing with the maximum percentage effect for each chemical to obtain a standardized percentage hyperactivity effect leading to 100% maximum effect for all hyperactive chemicals (Figure 2). This allowed us to obtain a similar half-maximum effect (EC_{50}) for the 3 chemicals. Skipping this hyperactivity standardization step would have led to the unpredictability of mixture effects higher than that of the chemical with the least maximal effect. Scholze et al. [29] used the toxic unit extrapolation approach to equalize and extend the dose–response curves for partial agonists. However, the observed hyperactivity effect in this study is usually followed by hypoactivity (possibly due to paralysis) at higher concentrations and this could indicate a saturated hyperactive effect. This appears not to support partial agonism but rather, the differential maximal effect of the 3 chemicals could be an indication of different mechanisms of hyperactive action. A partial agonist is expected to act as an antagonist in the presence of a full agonist [30] but this was not observed in the present study. Consequently, we consider the standardized percentage hyperactivity effect to be more representative of the observations and for mixture modeling in this study. The effect concentration causing a 50% increase or decrease of the STC was estimated from the concentration-response curve and the confidence interval was estimated as 2 times the standard error.



Figure 2. Visual representation of the data transformation for hyperactivity-inducing chemicals: (**A**) Concentration response curves showing different maximal for the hyperactivity inducing substances. The horizontal lines show EC_{50} , EC_{41} and EC_{24} which corresponds to the 50% effect for hexaconazole, chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon respectively; (**B**) Standardized concentration–response curves for the hyperactivity substances. The horizontal line shows the same 50% effect for the 3 substances after standardization. Data taken from Ogungbemi et al. (2020) [17].

2.6. Measurement of the Exposure Concentrations

Measurement of exposure concentrations was conducted to verify that test compounds were present in adequate concentrations in the test. Chemical measurement was performed only for one independent experiment of the binary mixtures since the same relation of measured and nominal concentrations were expected for other independent experiments and also for the ternary mixture. For quantifying chlorpyrifos/chlorpyrifosoxon and chlorpyrifos/hexaconazole mixtures, chemical analyses were conducted using an HPLC system (Merck-LaChrom) with diode array (model L7450) detector. One mL of the exposure solution for each concentration of the respective mixtures was sampled and 30 µL was injected directly. A reversed-phase column (Lichrospher 60 Reverse Phase (RP) select B, Merck, C-8), with a particle size of 5 μ m was used. The column temperature was set to 40 °C and the flow rate was adjusted to 0.5 mL/min. Different mobile phase ratios of AcN:water was used for chlorpyrifos/chlorpyrifos-oxon (57:43%, elution time of 15 min) and chlorpyrifos/hexaconazole (65:35%, elution time of 12 min). The substances were detected at an absorbance of 207 nm. For quantifying carbamazepine/propafenone and abamectin/propafenone mixtures, chemical analyses were performed on a linear ion trap/Orbitrap (LTQ Orbitrap XL) mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were diluted 100 (carbamazepine/propafenone) and 10 (abamectin/propafenone) times with ISO water before injection. An Agilent 1200 series HPLC system with a Kinetex C18 column ($100 \times 3 \text{ mm}$, 2.6 μ m particle size, Phenomenex) was used for chromatographic separation after injection of 10 μ L of sample. We used 0.1% formic acid and methanol containing 0.1% formic acid as mobile phases at a column temperature of 40 °C and a flow rate of 0.4 mL/min. The analysis was conducted in full scan mode with a mass range of m/z 100–1000 in negative and positive mode ESI with a nominal resolving power of 100,000 (referenced to m/z 400). For peak integration, compound calibration, and compound quantification, the software program TraceFinder 3.2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used.

3. Results

3.1. Chemical Analysis

Results of the chemical analysis are shown in Table 3. Measured concentrations were close to the nominal concentration, typically with a maximum deviation of about 20% for the highest tested concentrations for propafenone (+37 in Hypoactive Mixture A and -3% in Hypoactive Mixture B), carbamazepine (-8.8%), chlorpyrifos (-20 and -20% in both mixtures), chlorpyrifos-oxon (+19%) and hexaconazole (+15%). Measured concentrations of abamectin were below the detection limit (MDL) in all measurements. Reasons might be due to losses or rather adsorption to the test vessels because of its high lipophilicity (logD_{pH7.4(ACD/Labs)} of 5.85). It is important to note that chlorpyrifos concentrations in DMSO stock solutions declined by 25–40% after 2 months of storage. However, this reduction in concentration did not lead to a significant difference in the STC effect (Data not shown). Therefore, we used the nominal concentrations for further mixture toxicity evaluations based on the assumption that a 20% difference between nominal and measured concentrations will not cause a significant change in the observed effect.

Table 3. Measured concentrations of single substances in each mixture in micromole/liter. Values in round brackets are the percentage change of the measured concentrations with respect to the nominal concentrations while values in squared brackets are nominal concentrations that are below detection limit.

Hyperactive Mixture A		Hypoactive Mixture A		Hyperactive Mixture B		Hypoactive	Mixture B
Chlorpyrifos	Chlorpyrifos- Oxon	Carbamazepine	Propafenone	Chlorpyrifos	Hexaconazole	Abamectin	Propafenone
<mdl [0.25]<="" td=""><td><mdl [0.05]<="" td=""><td>92.2 (+36)</td><td>22.1 (+120)</td><td><mdl [0.2]<="" td=""><td>0.4(-4)</td><td><mdl [0.009]<="" td=""><td>6.0 (+37)</td></mdl></td></mdl></td></mdl></td></mdl>	<mdl [0.05]<="" td=""><td>92.2 (+36)</td><td>22.1 (+120)</td><td><mdl [0.2]<="" td=""><td>0.4(-4)</td><td><mdl [0.009]<="" td=""><td>6.0 (+37)</td></mdl></td></mdl></td></mdl>	92.2 (+36)	22.1 (+120)	<mdl [0.2]<="" td=""><td>0.4(-4)</td><td><mdl [0.009]<="" td=""><td>6.0 (+37)</td></mdl></td></mdl>	0.4(-4)	<mdl [0.009]<="" td=""><td>6.0 (+37)</td></mdl>	6.0 (+37)
0.2 (-59)	<mdl [0.1]<="" td=""><td>128.0 (+20)</td><td>33.1 (+89)</td><td>0.2 (-50)</td><td>0.8 (+5)</td><td><mdl [0.018]<="" td=""><td>11.4 (+31)</td></mdl></td></mdl>	128.0 (+20)	33.1 (+89)	0.2 (-50)	0.8 (+5)	<mdl [0.018]<="" td=""><td>11.4 (+31)</td></mdl>	11.4 (+31)
0.7 (-32)	0.5 (+109)	190.8 (+11)	47.7 (+70)	0.6 (-37)	1.8 (+10)	<mdl [0.035]<="" td=""><td>20.2 (+15)</td></mdl>	20.2 (+15)
1.8 (-12)	0.6 (+39)	250.7 (-8.8)	61.3 (+37)	1.4 (-23)	3.6 (+10)	<mdl [0.07]<="" td=""><td>31.4 (-10)</td></mdl>	31.4 (-10)
3.2 (-20)	1.1 (+19)			2.8 (-20)	7.5 (+15)	<mdl [0.14]<="" td=""><td>68.0 (-3)</td></mdl>	68.0 (-3)

MDL = Method detection limit. Chlorpyrifos MDL = 0.1μ M, Chlorpyrifos-oxon MDL = 0.1μ M, Hexaconazole MDL = 0.3μ M, Carba-mazepine MDL = 0.0045μ M, Propafenone MDL = 0.0034μ M, Abamectin MDL = 0.0005μ M.

3.2. Description of Mixture Effect in Comparison to CA and IA Models

The effects of single substances used in the mixture testing have already been described in Ogungbemi et al. [17] and are summarized in Table 1. The mixture effects exceeded those of the single substances for all mixtures. Concentration–response curves for the observed and predicted mixture effects, as well as those for the single substances, are shown in Figure 3. Observed and predicted EC_{50} values are also shown in Table 2.



Figure 3. Comparison of observed (Mix) versus predicted effects of binary mixtures based on the concentration addition (CA) and independent action (IA) models in the STC. Furthermore, mixture effects are compared to single substances effects: (**A**) Hyperactivity Mixture A; (**B**) Hypoactivity Mixture A; (**C**) Hyperactivity Mixture B; (**D**) Hypoactivity Mixture B. Grey shaded areas represent the confidence interval of the fitted mixture model for the observed effect. Different symbols represent the observed mean of the STC effect for 20 embryos exposed in independent mixture experiments.

Hyperactive Mixture A (chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon) (see Section 2.3 or Table 2 for the definition of the mixture name) induced hyperactivity with an EC_{50} of 1.25 μ M. The CA and IA models were similar and they both predicted the EC_{50} of the mixture (Table 2). The prediction curves were within the confidence boundary of the tested mixture at low and mid concentrations but both models slightly deviated and overestimated the effect at higher concentrations (Figure 3A). The Hypoactive Mixture A (carbamazepine and propafenone) caused hypoactivity with an EC_{50} of 132 μ M. Both CA and IA (EC_{50} of 159 μ M and 207 μ M, respectively) underestimated the mixture effect. Nevertheless, CA was predictive at low and medium-high concentrations (50–150 μ M) while IA was less predictive and slightly underestimated the hypoactivity effects except at the lowest concentration range up to 100 μ M (Figure 3B). Overall the estimation difference was always below a factor of 2 for CA and IA. Hyperactive Mixture B (chlorpyrifos and hexaconazole) showed hyperactivity with an EC_{50} of 2.79 μ M (Table 2). CA could predict the exact observed EC_{50} of the mixture but IA slightly underestimated the mixture effect [$EC_{50} = 3.69 \mu$ M] (Figure 3C). Hypoactive Mixture B (abamectin and propafenone) showed hypoactivity with an EC_{50} of 17.4 μ M. Both CA and IA slightly underestimated the mixture toxicity with EC_{50} values of 23 and 27.6 μ M respectively. CA aligned with the confidence boundary of the observed mixture effect while IA deviated from the observed concentration–response curve (Figure 3D). Further, we tested a ternary mixture (Mixture C comprising of chlorpyrifos, chlorpyrifosoxon and hexaconazole). Both CA and IA models showed similar predictions and were predictive of the observed mixture effect (Figure 4). In general, we observe a trend where CA and IA could very well predict mixture hyperactivity effects but to a slightly lesser extent for the hypoactivity effects—though these differences were minor.



Chlorpyrifos x Hexaconazole x Chlorpyrifos-oxon mix

Figure 4. Comparison of observed (Mix) versus predicted effects of a ternary mixture based on the concentration addition (CA) and independent action (IA) models for mixture C. Furthermore, mixture effects are compared to single substances effects: Grey shaded areas represent the confidence interval of the fitted mixture model for the observed effect. Different symbols represent observed mean of STC effect for 20 embryos exposed in independent mixture experiments.

Further, we investigated the CA assumption that substances are dilutions of each other. Results show that substituting portions of chlorpyrifos in the Hyperactivity Mixtures A and B with hexaconazole and chlorpyrifos-oxon respectively, induced similar concentration–response curves as the non-substituted mixture (Figure 5A,B). The mixture of chlorpyrifos-oxon and (chlorpyrifos + hexaconazole) showed an EC_{50} of 1.77 μ M which was higher than that of chlorpyrifos-oxon and chlorpyrifos mixture by only a factor of 1.4. An EC_{50} of 2.13 μ M was estimated for hexaconazole and (chlorpyrifos + chlorpyrifos-oxon) which was lower than the hexaconazole and chlorpyrifos mix by only a factor of 1.3.


Figure 5. A ternary mixture is used to simulate a binary mixture by replacing a portion of one of the binary components with an equitoxic proportion of another substance: (**A**) Concentration–response curves for Hyperactive Mixture A containing chlorpyrifos-oxon and chlorpyrifos. Portions of chlorpyrifos were replaced with hexaconazole; (**B**) Concentration–response curves for Hyperactive Mixture B containing hexaconazole and chlorpyrifos. Portions of chlorpyrifos were replaced with chlorpyrifos.

3.3. Antagonistic Mixture Effects in the STC Test

Exposure of substances inducing opposing effect direction may induce antagonistic effects. Therefore, we exposed a ternary mixture of dissimilar substances (Mixture D) with different mechanisms of action and opposing effect directions (i.e., hyper- and hypoactivity). Mixtures were designed to reflect an unequitoxic scenario (0.33 hypoactivity: 0.66 hyperactivity; with respect to the corresponding EC_{50} values) by mixing the hypoactivity causing abamectin with two hyperactivity causing substances (chlorpyrifos and hexaconazole). The result shows that the antagonistic effect of abamectin significantly decreased the hyperactivity effect expected from hexaconazole and chlorpyrifos (Hyperactive Mixture B). Furthermore, hypoactivity effect relative to control was observed at mid-high concentration of the mixture (Figure 6).



Figure 6. Comparison of concentration–response curves for hexaconazole and chlorpyrifos (Hyperactive Mixture B) with or without the addition of abamectin. Addition of abamectin decreases the hyperactivity effect (i.e., indicating an antagonistic effect) observed for the mixture without abamectin. A gaussian function was fitted to the data to model the biphasic effect of the mixture with abamectin.

4. Discussion

In order to evaluate the mixture toxicity of neuroactive compounds, two main challenges have to be considered regarding the application of prediction models: (1) Neuroactive chemicals in mixtures interact with different biochemical targets. To capture the effects of such a mixture, a possibility is to measure the effects at converging key events. (2) Mixtures may comprise of neuroactive chemicals with opposing effects. Consequently, we explored (1) whether mixture effects of neuroactive substances with similar effect directions (whether hyper- or hypoactivity) but different mechanisms of action would be additive and if concentration addition (CA) or independent action (IA) models can predict such mixture effect and (2) if mixtures of neuroactive substances with different mechanisms/modes of action and opposing effect direction would induce observable antagonistic effects. In order to address these challenges, we used an established behavior test, the spontaneous tail coiling (STC) of zebrafish embryos. It is responsive to diverse mechanisms of actions that finally translate to increased or reduced frequency of spontaneous movements as a result of either activation or inhibition of the neuronal synapse leading to hyper- or hypoactivity respectively (STC neuroactivity hypothesis). Accordingly, we hypothesized that neuroactive chemicals inducing the same response (either hyper- or hypoactivity) in the STC test can be predicted from CA or IA models. In contrast, compounds with modes of action with opposing effects would result in antagonistic effects if compared to individual compounds.

4.1. Mixture Components with Different Mechanisms of Action but Similar Effect Direction Can Act in an Additive Way

The first goal of the present study was focused on addressing the question—"Can additivity be assumed for a mixture of substances with the same mode of action (e.g., antiandrogenic) but not the same mechanism of action (e.g., receptor-blocking and inhibition of androgen production)?" which was posed in Kortenkamp et al. [31]. Based on theory, the CA model is adequate to predict mixture toxicity of similarly acting components (i.e., similar mechanisms of action) while IA is assumed to hold for dissimilarly acting

chemicals. However, CA may also be applied to predict the effect of chemicals showing similar toxicological responses (i.e., hyper- or hypoactivity) or modes of action [32]. We hypothesized that irrespective of the mechanism of action, compounds inducing the same toxicological response (whether hyper- or hypoactivity) would also lead to an additive response in the STC. This allows defining the similarity/dissimilarity of mixture components based on the combined knowledge of both the mechanism of action and toxicological response. Results from the current study indicate that mixture toxicity of chemicals such as propafenone and abamectin as well as chlorpyrifos and hexaconazole that are known to induce different mechanisms of action but similar effect directions were predictable using CA and IA models. (Figure 3C,D). Predictions of the IA model were very close to those of CA and this is not surprising for a binary mixture considering that the differences between the models increase with more mixture components [33]. However, there was also no difference in the prediction of CA and IA for the ternary Mixture C (Figure 4). CA and IA models could also predict the combined effect of pyrethroids and organophosphates in a D. magna immobility assay [34]. The predictability of the mixture models for differing neuro-mechanisms as observed in zebrafish embryos and daphnids may not be applicable in other test systems or endpoints with different levels of complexity or specificity [35]. For instance, CA and IA are expected to give different predictions for simpler but specific neuro-endpoints such as neural electric signal which may not reflect an integrated output as the STC but this remains to be investigated. Therefore, it is dependent on the mechanistic understanding of the test endpoint if neuroactive substances acting on different targets in the nervous system should be considered as similarly or dissimilarly acting components [34]. This also indicates that the assessment of similarity/dissimilarity of mixture components should go beyond knowledge of molecular targets and should consider other factors such as toxicological response and secondary mode of action [36].

4.2. Mechanistic Understanding of the Predictability Power of CA and IA

The STC is presumed to be generated by depolarizations which trigger action potentials in the synapses of the primary motor neurons [37]. Consequently, it is not farfetched to consider different target interactions or mechanisms of action as similarly acting in so far as they result in the same key event (activation or inhibition of neuronal synapses) and same toxicological response (hyper- or hypoactivity). In this case, we may consider neuroactivity via the STC endpoint to be an integrated effect on neuronal synapses and CA might be more appropriate to predict mixture effects of chemicals in the STC. We showed in the present study the capacity of CA to predict mixture B (substances with different mechanisms of action but similar effect direction). This is consistent with previous studies on nervous system-related endpoints. For example, Wolansky et al. [38] found that CA was a good predictor of the mixture neurotoxicity of different pyrethroids on the motor activity of rats and Gonçalves et al. [39] reported that CA was adequate to predict the mixture effect of PAHs on fish behavior.

Based on the confidence interval of the experimental mixture, the IA model was slightly less predictive (a factor of about 1.6% deviation) for hypoactivity effects (Figure 2B,D). This could be due to unspecific effects such as axonal deformation and malformations which might contribute additional effect to the primary hypoactivity of the embryo [17]. Such additional effects would likely be captured as an integrative hypoactivity effect in the CA model. Further, the accuracy of the IA model in complex organisms such as zebrafish embryos has been questioned due to converging signaling pathways and inter-dependent subsystems [31,35,40]. For instance, Corbel et al. [10] found that carbamate and pyrethroid had a converging effect on acetylcholine concentration in the synapse even though they have different mechanisms of action. Estrogen receptor activation was also seen as an integrated effect of different cascading steroidal receptor signaling [29]. In addition, we could simulate concentration additive mixtures by replacing a portion of the mixture component with another similar acting substance (similar effect direction but different mechanism of action) (Figure 4A,B). This adds credence to the CA assumption that components can be described as a dilution of

each other in the STC test. However, the results of mixture assessment with STC do not allow to favor one of the models as the differences between CA and IA were quite small.

Mixture toxicity prediction using CA and IA models assumes that the mixture components do not interact to affect the uptake, distribution, metabolism and elimination of each other [8,41]. Mixture interaction of neuroactive substances may occur via the biotransformation pathways due to the reduced activation or competition for biotransformation sites [42]. Organophosphates were found to be a major synergistic group due to their ability to inhibit esterases which are responsible for phase 2 biotransformation of chemicals [43]. However, we did not observe synergistic interaction of a mixture of chlorpyrifos and its oxon metabolite in the present study and this could be due to potential limited biotransformation capacity of early stages of the zebrafish embryo [44] or the sensitivity of our test system. Other mixture neurotoxicity studies have shown interaction effects. For example, a mixture of chlorpyrifos and nickel on zebrafish embryos was found to be antagonistic [45] and the mixture of atrazine and chlorpyrifos was assessed as synergistic [46]. However, 120 and 96 hpf embryos, which should have higher rates for biotransformation into the active oxon metabolite, were used in these studies.

4.3. Mixture Components with Different Mechanisms of Action and Opposing Effect Direction Are Antagonistic

We investigated the STC outcome for mixtures comprising of different mechanisms of action as well as opposing effect directions (Mixture D). The results show that mixtures with both hyper- and hypoactivity-inducing components will lead to antagonistic interaction (Figure 6). Our results corroborate the recommendation of a chemical grouping for mixture analysis based on common adverse outcomes (hyper- and hypo-activity in this case) with less emphasis on the similarity of the mechanism of action [31]. Information on common adverse outcomes such as hyper- and hypoactivity will be useful to qualitatively predict mixture outcomes of multi-component/complex mixtures as well as to understand deviations from additivity. For instance, the antagonistic effects of abamectin on the hyperactivity level of the mixture of chlorpyrifos and hexaconazole (Figure 6) would have been unexplainable if only a mechanism of action-based classification was used. This particularly applies to endpoints with opposing effect directions such as locomotor activity or even gene response. For such endpoints, chemicals that primarily induce hyperactivity at low concentrations may cause hypoactivity at higher concentrations due to seizures and paralysis [13]. The use of chemicals inducing such biphasic activity as a component in a mixture without considering the primary effect direction could lead to misinterpretation of its impact on the combined effect. This biphasic activity was also observed for Mixture D in the current study and could be due to the relatively higher counteractive potency of abamectin (EC₅₀ of $0.06 \,\mu$ M) induced at high mixture concentrations in comparison to the hyperactivity effect of chlorpyrifos and hexaconazole with much higher EC_{50} s (Figure 6).

Hyper- and hypoactivity response could also be used as an effect-based strategy for bio-monitoring of complex environmental mixtures which can facilitate the identification of chemicals inducing mixture neurotoxicity that would not have been detected with analytical chemical measurements [47,48]. However, equitoxic ratio of substances with opposing effect direction could lead to normalization or mitigation of the expected individual effects or mixture effects approaching control level. This counteracting effect could be a huge challenge for diagnostic risk assessment. Therefore, effect evaluation with STC as converging key event of a complex environmental mixture may only indicate an effect size related to the amount of neuroactive components if they show effect in the same direction (i.e., hyper- or hypoactivity). With opposing effects in the STC, effect evaluation may not relate to the cumulative exposure levels. However, this may present a better evaluation of the exposure level regarding the relevant biological effects and potential hazards. Nevertheless, a solution could be to spike environmental mixtures with a positive control such that deviations from the known effect size of the positive control could be an indication of the inherent effect of the mixture. In prospective mixture evaluation, one solution could be to employ a non-equitoxic mixture ratio design (e.g., 25% compound A

and 75% compound B or vice versa) for opposing acting substances such that the strength of the counteracting effect is weakened. This non-equitoxic design was useful to evaluate Mixture D in the current study. However, this approach may lead to hidden effects and could give a false perspective of effect assessment. Regardless, it is necessary to elaborate on when effect normalization is an acceptable ecological risk.

5. Conclusions

We found that mixtures of neuroactive substances with different mechanisms of action but similar effect direction are additive and could be predicted using CA or IA models. Convergence and integration of effects in the nervous system provides a mechanistic understanding to support similarity classification of neuroactive compounds not only based on mechanisms of action but also considering the toxicological response or effect direction (whether hyper- or hypoactivity). Consequently, we recommend considering toxicological response or effect direction as an additional grouping factor when applying CA and IA models. On the other hand, mixtures of substances with different mechanisms of action and opposing effect direction are antagonistic. Being able to detect neurotoxicity within an environmental sample (complex mixture) is relevant since neuroactive chemicals are usually dominating concentrations of contaminants in the environment and may be major drivers of mixture toxicity. Since established effect-based tools may overlook or may not capture neurotoxicity, in this study, we propose a way to use the STC test for risk assessment despite counteracting effects which could complicate proper evaluation.

Author Contributions: Conceptualization, A.O.O., R.M., R.A., S.S. and E.K.; methodology, A.O.O., R.M., S.S. and E.K.; formal analysis, A.O.O., R.A. and E.K.; investigation, A.O.O.; writing—original draft preparation, A.O.O.; writing—review and editing, A.O.O., R.M., R.A., S.S. and E.K.; visualization, A.O.O.; supervision, E.K. and S.S.; project administration, E.K.; funding acquisition, E.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the Neurobox Project (FKZ 02WRS1419F). In addition parts of the study were cofinanced by the UFZ integrated project Exposome.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in Zenodo at https://doi.org/10.5281/zenodo.4640059.

Acknowledgments: Firstly, we would like to acknowledge the high-spirited patronage by the late Tamara Grummt throughout the whole project! We also appreciate Gianina Jakobs and Franz Giersdorf for the discussions during the design of the experiments and for supporting the experimental work respectively. We highly acknowledge the help by Nicole Schweiger for fish culture and embryo production.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Faust, M.; Backhaus, T.; Altenburger, R.; Dulio, V.; van Gils, J.; Ginebreda, A.; Kortenkamp, A.; Munthe, J.; Posthuma, L.; Slobodnik, J.; et al. Prioritisation of water pollutants: The EU Project Solutions proposes a methodological framework for the integration of mixture risk assessments into prioritisation procedures under the European Water Framework Directive. *Environ. Sci. Eur.* 2019, 31. [CrossRef]
- Belden, J.B.; Gilliom, R.J.; Lydy, M.J. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2007, 3, 364–372. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Bliss, C.I. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Ann. Appl. Biol. 1939, 26, 585–615. [CrossRef]
- Hewlett, P.S.; Plackett, R.L. A Unified Theory for Quantal Responses to Mixtures of Drugs: Non-Interactive Action. *Biometrics* 1959, 15, 591–610. [CrossRef]
- Altenburger, R.; Backhaus, T.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L.H. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to Vibrio fischeri: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000, 19, 2341–2347. [CrossRef]

- 6. Backhaus, T.; Altenburger, R.; Boedeker, W.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L.H. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to Vibrio fischeri. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, 2348–2356. [CrossRef]
- Faust, M.; Altenburger, R.; Backhaus, T.; Blanck, H.; Boedeker, W.; Gramatica, P.; Hamer, V.; Scholze, M.; Vighi, M.; Grimme, L.H. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 2001, 56, 13–32. [CrossRef]
- Cedergreen, N.; Svendsen, C.; Backhaus, T. Toxicity Prediction of Chemical Mixtures. *Encycl. Environ. Manag.* 2013, 2572–2581. [CrossRef]
- Busch, W.; Schmidt, S.; Kühne, R.; Schulze, T.; Krauss, M.; Altenburger, R. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016, 35, 1887–1899. [CrossRef]
- Corbel, V.; Stankiewicz, M.; Bonnet, J.; Grolleau, F.; Hougard, J.M.; Lapied, B. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* 2006, 27, 508–519. [CrossRef]
- 11. Yang, Y.; Ma, H.; Zhou, J.; Liu, J.; Liu, W. Joint toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish. *Chemosphere* **2014**, *96*, 146–154. [CrossRef]
- 12. Strähle, U.; Scholz, S.; Geisler, R.; Greiner, P.; Hollert, H.; Rastegar, S.; Schumacher, A.; Selderslaghs, I.; Weiss, C.; Witters, H.; 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. [CrossRef]
- 13. Ogungbemi, A.; Leuthold, D.; Scholz, S.; Küster, E. Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: A review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes. *Environ. Sci. Eur.* **2019**. [CrossRef]
- 14. Saint-Amant, L.; Drapeau, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* **1998**, 37, 622–632. [CrossRef]
- 15. Kimmel, C.B.; Patterson, J.; Kimmel, R.O. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Dev. Psychobiol.* **1974**, *7*, 47–60. [CrossRef]
- 16. Selderslaghs, I.W.T.; Hooyberghs, J.; De Coen, W.; Witters, H.E. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **2010**, *32*, 460–471. [CrossRef]
- Ogungbemi, A.O.; Teixido, E.; Massei, R.; Scholz, S.; Küster, E. Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME[®]. *Neurotoxicol. Teratol.* 2020, *81*, 106918.
 [CrossRef]
- Zhang, K.; Liang, J.; Brun, N.R.; Zhao, Y.; Werdich, A.A. Rapid Zebrafish Behavioral Profiling Assay Accelerates the Identification of Environmental Neurodevelopmental Toxicants. *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55, 1919–1929. [CrossRef]
- 19. Vliet, S.M.; Ho, T.C.; Volz, D.C. Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *329*, 241–248. [CrossRef]
- 20. De Oliveira, A.A.S.; Brigante, T.A.V.; Oliveira, D.P. Tail coiling assay in zebrafish (Danio rerio) embryos: Stage of development, promising positive control candidates, and selection of an appropriate organic solvent for screening of developmental neurotoxicity (DNT). *Water* **2021**, *13*, 119. [CrossRef]
- Casida, J.E.; Durkin, K.A. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 2013, 58, 99–117. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Söderpalm, B. Anticonvulsants: Aspects of their mechanisms of action. Eur. J. Pain 2002, 6, 3–9. [CrossRef]
- 23. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, 203, 253–310. [CrossRef]
- 24. Sánchez-Bayo, F. Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **2012**, *s4*. [CrossRef]
- 25. Ogungbemi, A.O.; Teixido, E.; Massei, R.; Scholz, S.; Küster, E. Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior endpoint using a workflow in KNIME. *MethodsX* **2021**, *8*, 101330. [CrossRef]
- Teixido, E.; Klüver, N.; Ogungbemi, A.O.; Küster, E.; Scholz, S. Evaluation of Neurotoxic effects in zebrafish embryos by automatic measurement of early motor behaviors. In *Experimental Neurotoxicology Methods*; Neuromethods; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021.
- 27. Zhu, X.W.; Chen, J.Y. Mixtox: An r package for mixture toxicity assessment. R J. 2016, 8, 422–434. [CrossRef]
- 28. Ritz, C.; Streibig, J.C. Bioassay analysis using R. J. Stat. Softw. 2005, 12. [CrossRef]
- 29. Scholze, M.; Silva, E.; Kortenkamp, A. Extending the applicability of the dose addition model to the assessment of chemical mixtures of partial agonists by using a novel toxic unit extrapolation method. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [CrossRef]
- 30. Jackson, A. Partial Agonist. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*; Stolerman, I.P., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 959–960. ISBN 978-3-540-68706-1.
- 31. Kortenkamp, A.; Backhaus, T.; Faust, M. State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report Contract N. 2009, pp. 1–391. Available online: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf (accessed on 6 December 2017).
- 32. Cleuvers, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 185–194. [CrossRef]

- 33. Drescher, K.; Boedeker, W. Assessment of the Combined Effects of Substances: The Relationship between Concentration Addition and Independent Action. *Biometrics* **1995**, *51*, 716–730. [CrossRef]
- 34. Rose, S.; Altenburger, R.; Sturm, A. Mixture toxicity effects of sea louse control agents in Daphnia magna. *Chemosphere* **2016**, 144, 599–606. [CrossRef]
- 35. Jakobs, G.; Krüger, J.; Schüttler, A.; Altenburger, R.; Busch, W. Mixture toxicity analysis in zebrafish embryo: A time and concentration resolved study on mixture effect predictivity. *Environ. Sci. Eur.* **2020**, *32*, 143. [CrossRef]
- 36. Cedergreen, N.; Christensen, A.M.; Kamper, A.; Kudsk, P.; Mathiassen, S.K.; Streibig, J.C.; Sørensen, H. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 1621–1632. [CrossRef]
- 37. Drapeau, P.; Saint-Amant, L.; Buss, R.R.; Chong, M.; McDearmid, J.R.; Brustein, E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 2002, *68*, 85–111. [CrossRef]
- 38. Wolansky, M.J.; Gennings, C.; DeVito, M.J.; Crofton, K.M. Evidence for dose-additive effects of pyrethroids on motor activity in rats. *Environ. Health Perspect.* 2009, 117, 1563–1570. [CrossRef]
- Gonçalves, R.; Scholze, M.; Ferreira, A.M.; Martins, M.; Correia, A.D. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ. Res.* 2008, 108, 205–213. [CrossRef]
- 40. Schmidt, S.; Busch, W.; Altenburger, R.; Küster, E. Mixture toxicity of water contaminants-effect analysis using the zebrafish embryo assay (Danio rerio). *Chemosphere* **2016**, *152*, 503–512. [CrossRef]
- 41. Altenburger, R.; Nendza, M.; Schüürmann, G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, 22, 1900–1915. [CrossRef]
- 42. Corbett, J.R. The Biochemical Mode of Action of Pesticides; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1974; 330p. [CrossRef]
- 43. Cedergreen, N. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE* **2014**, 9. [CrossRef]
- 44. Kühnert, A.; Vogs, C.; Aulhorn, S.; Altenburger, R.; Küster, E.; Busch, W.; Kühnert, A.; Vogs, C.; Altenburger, R.; Hollert, H.; et al. Biotransformation in the zebrafish embryo –temporal gene transcription changes of cytochrome P450 enzymes and internal exposure dynamics of the AhR binding xenobiotic benz[a]anthracene. *Environ. Pollut.* **2017**, 230, 1–11. [CrossRef]
- 45. 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. [CrossRef]
- Pérez, J.; Domingues, I.; Monteiro, M.; Soares, A.M.V.M.; 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.* 2013, 20, 4671–4680. [CrossRef] [PubMed]
- Bal-Price, A.; Crofton, K.M.; Leist, M.; Allen, S.; Arand, M.; Buetler, T.; Delrue, N.; FitzGerald, R.E.; Hartung, T.; Heinonen, T.; et al. International STakeholder NETwork (ISTNET): Creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes. *Arch. Toxicol.* 2015, *89*, 269–287. [CrossRef] [PubMed]
- 48. De Baat, M.L.; Kraak, M.H.S.; Van der Oost, R.; De Voogt, P.; Verdonschot, P.F.M. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water Res.* 2019, 159, 434–443. [CrossRef] [PubMed]

MethodsX 8 (2021) 101330



Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex

Method Article

Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior endpoint using a workflow in KNIME



Afolarin O. Ogungbemi^{a,b,*}, Elisabet Teixido^{a,1}, Riccardo Massei^c, Stefan Scholz^a, Eberhard Küster^a

^a Department of Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstraße 15, Leipzig 04318, Germany

^b Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, 76829, Fortstraße 7, Landau, Germany

^c Department of Effect-Directed Analysis, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, Leipzig 04318, Germany

ABSTRACT

Neuroactive substances are the largest group of chemicals detected in European surface waters. Mixtures of neuroactive substances occurring at low concentrations can induce adverse neurological effects in humans and organisms in the environment. Therefore, there is a need to develop new screening tools to detect these chemicals. Measurement of behavior or motor effects in rodents and fish are usually performed to assess potential neurotoxicity for risk assessment. However, due to pain and stress inflicted on these animals, the scientific community is advocating for new alternative methods based on the 3R principle (reduce, replace and refine). As a result, the behavior measurement of early stages of zebrafish embryos such as locomotor response, photomotor response and spontaneous tail coiling are considered as a valid alternative to adult animal testing. In this study, we developed a workflow to investigate the spontaneous tail coiling (STC) of zebrafish embryos and to accurately measure the STC effect in the KNIME software. We validated the STC protocol with 3 substances (abamectin, chlorpyrifos-oxon and pyracostrobin) which have different mechanisms of action. The KNIME workflow combined with easy and cost-effective method of video acquisition makes this STC protocol a valuable method for neurotoxicity testing.

- Video acquisition duration of 60 s at 25 \pm 1 hpf was used
- 20 embryos exposed per dish and acclimatized for 30 min before video acquisition
- Capability to inspect and correct errors for high accuracy

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101330

2215-0161/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

DOI of original article: 10.1016/j.ntt.2020.106918

^{*} Corresponding author at: Department of Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstraße 15, Leipzig 04318, Germany.

E-mail address: afolarin.ogungbemi@ufz.de (A.O. Ogungbemi).

¹ Present Address: GRET-Toxicology Unit, Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Method name: Spontaneous tail coiling test with zebrafish embryos

Keywords: Developmental neurotoxicity, Behavior toxicology, Spontaneous activity, Hyperactivity, Hypoactivity, Alternatives to animal testing

Article history: Received 19 November 2020; Accepted 26 March 2021; Available online 4 April 2021

Specifications Table

Subject Area:	Agricultural and Biological Sciences
More specific subject area:	Ecotoxicology; Neurotoxicology; Behavior toxicology
Method name:	Spontaneous tail coiling test with zebrafish embryos
Name and reference of original	Saint-Amant, L. and Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor
method:	behaviors in the zebrafish embryo. Journal of neurobiology, 37(4), pp.622–632.
	https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199,812)37:4%3C622::AID-
	NEU10%3E3.0.CO;2-S
Resource availability:	KNIME workflow: https://hub.knime.com/elisabet_t/spaces/Public/latest/Spontaneous%
	20tail%20coilings-measurement
	KNIME setup: https://youtu.be/wgJN71zTvRw

Background

The spontaneous tail coiling (STC) represents the earliest motor activity observed in the developing neural network of zebrafish embryos. It is assumed to be mediated by the innervation of the muscle by the primary motor neurons, which are first present at around 17 hpf [5,11,13]. These motor neurons are known to originate in the spinal cord. In contrast, another early motor behavior, the photomotor response requires a high-intensity light stimulus which is mediated in the hindbrain [10]. A comparison between the PMR test and the STC test has been previously published [6]. Counting the average STC in the embryos is considered to be a fast and reliable behavioral endpoint which finds its application in the screening of neuroactive substances or for general toxicological screening [7]. A previous review has also identified the STC test to be more sensitive to detect organophosphate insecticides in comparison to other commonly used behavior tests such as locomotor activity and photomotor response [6]. Different software are available to measure the STC, however, most of them are expensive and may not allow for a manual correction or quality check of the assessment (i.e. identification of embryos not labeled appropriately). As a result, the actual count of the STC may be inadequately assessed. The aim of the current method paper is to describe a way to accurately and automatically count the STC using a workflow in the open and free KNIME software.

Embryo selection and exposure

Adult zebrafish (OBI and WIK strains) were obtained from a local commercial breeder and crossed to obtain a hybrid strain (OBI-WIK, F3 generation). Fish were cultured under 14 h light/10 h dark photoperiod in 120 L aquaria. Spawning trays were placed in the tanks on the afternoon 4–6 h before the end of the light cycle. The following day, lights were automatically switched on at 8am to initiate the spawning and eggs were collected at 9am. In order to remove dirt and debris, the eggs were washed several times with ISO water. After washing, fertilized eggs between 2 and 3 hpf were selected under a stereomicroscope. Twenty embryos were exposed to 20 mL of test chemical in 40 mL glass petri-dish (60 mm diameter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe Germany) and covered with a glass lid to prevent evaporation or cross-contamination. Glass dishes were incubated at 28 °C till the next day. Exposure was conducted with 14 glass dishes representing 7 concentrations and 2 replicates including the negative and positive control (Fig. 1). The glass dish exposure system allowed high resolution video-taping and was therefore preferred over multi-well plates. However, provided that a sufficient resolution can be provided for video recording of the entire well or individual wells, the protocol could be adopted for multi-well plates.



Fig. 1. Visual representation of the arrangement of the exposure glass dishes and the direction of measurement during video acquisition. The measurement starts with all treatments of replicate 1 followed by replicate 2.

Specific procedure:

- (1) ISO water was prepared according to ISO 7346–3 (1996) [80 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM MgSO₄·7H₂O, 31 mM NaHCO₃, 3.1 mM KCl]
- (2) Chemical stock solutions were prepared a day before in ISO water or were already standing on the bench when prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The stock solution was diluted to give lower concentrations in 50 mL standard volumetric flasks.
- (3) The glass petri-dishes were labeled with the necessary experiment information according to the number of treatments and replicates
- (4) Twenty fertilized embryos (2–3 hpf) were selected and transferred into each labeled dish. Embryos were transferred into the dishes systematically i.e. first replicate for all treatments starting from lowest to highest concentration were filled and followed by the second replicate. This system models the video acquisition format (see Fig. 1). This ensures that similar time offset is transferred from the embryo selection to the video acquisition phase.
- (5) The selected embryos were exposed to each chemical concentration and ISO water as negative control. Water was first removed using a pipette and 20 mL of the respective exposure solution was added into the dishes. A solvent control should be used when solvents are used to prepare the chemical solution.
- (6) The dishes were covered and Incubated at 28 °C overnight.

Video acquisition

On the next day, the microscope and camera were setup for video acquisition. The embryos were removed from the incubator and allowed to acclimatize at room temperature for at least 30 min. The acclimatization period aimed to ensure a constant measuring temperature since the microscope was not contained within an incubator. We found in a previous study [7] that this equilibration temperature of 30 min enabled the reproducible assessment of STC. Beginning at 9AM \pm 0.25 h, each glass dish was videotaped for 1 min. The videotaping was done systematically such that the first replicate of each concentration starting from negative controls to highest concentration was recorded, followed by the second replicate (Fig 1). Additionally, the negative controls could be recorded again at the end to ensure the stability of the STC measurement.

Specific procedure:

(1) The computer screen, camera (Olympus DP21) and stereomicroscope (Olympus SZX7) were turned-on. Light source was from a LED illumination base of the microscope.



Fig. 2. Automated workflow for STC analysis in KNIME. (a) Video files (AVI format) are converted to image stacks. (b) A threshold is applied to identify the location of the embryos in the image, (c) the binary image is segmented and (d) adjacent touching embryos are separated using morphological operations. (e) Variance of pixels between frames are identified to indicate movement. The graph shows the variance of one selected embryo. (f) Each peak (indicated by a dashed vertical line) represents an individual tail flip. Peaks were identified using an R script embedded in a KNIME workflow. The plot show the STC peaks of one embryo within a duration of 60 s or 120 frames.

- (2) The magnification of the microscope was set to 0.8X and the background base was tuned to dark background to create a contrast against the transparent embryos.
- (3) Camera settings were ISO = 400; shutter speed = 1/80, image size = 400×300 pixels and image resolution = 1600×1200 pixels. Other types of camera including a mobile phone camera may be used to collect videos if quality requirements are met.
- (4) Embryos at \approx 24–25 h post fertilization were removed from the incubator and equilibrated at room temperature for at least 30 min.
- (5) Embryos were assessed for developmental malformations and lethality under the stereomicroscope. Deformed or dead embryos were removed or separated. Number of removed embryos were recorded in a data sheet.
- (6) All normal embryos were clustered to the center by slightly swirling the dish and forceps were used to improve the clustering when required. Embryos were placed side by side and not super imposed on each other (Fig. 2a).
- (7) Embryos were videotaped for 1 min using a stop clock. Embryos could be monitored or observed during video acquisition via the computer screen. It is important to keep the table holding the camera still during video recording.
- (8) Video acquisition was completed within a period of \approx 30 min in order to avoid confounding effects of developmental stage within an experiment i.e. 2 min per dish or 28 min for 7 treatments and 2 replicates.
- (9) A second chemical exposure may be conducted in parallel by following the same procedure as for the first chemical i.e. preparation of chemical solutions, embryo selection may be conducted simultaneously but video acquisition should be performed in blocks of independent experiments.
- (10) The videos were stored in a mobile drive and transferred to a local or cloud drive for further analysis.



Fig. 3. The STC workflow in KNIME.

KNIME setup and analysis

Description of the KNIME® workflow

The workflow (Fig 3) computes how many times an embryo moves by image analysis using the video recordings. The workflow is divided in several sections using "metanodes" representing a collection of several other nodes, each responsible for a specific calculation (basic description of the KNIME® Analytical Platform can be consulted in [1,3]).

The workflow requires video recordings in AVI format as input and iterates over all video files in the selected folder. The video files are converted to stacks of images using the FFmpeg tool (2016) at a sample rate of 120 frames per minute. The program is executed by using the external tool node in KNIME®. The individual embryos in the image are detected by applying a threshold for conversion to binary images. Briefly, for each frame a median filter is applied to smooth the image and the background is subtracted using the ImageJ macro node (SubstractBackground function). Then a threshold is automatically set and applied using a variable node. The threshold is based on the mean pixel intensity of all frames, but it can be adjusted depending on the characteristics of the video files. The image with the applied threshold should display embryos completely filled in white and the background in black (Fig. 2b). Then images are segmented to label each embryo independently. In order to separate connected labels of adjacent embryos, the Waehlby cell clump splitter node in KNIME® is used [16]. Subsequently, various morphological image operations (e.g. erosion) are applied to optimize segmentation of individual embryos (Fig. 2c–d).

Subsequently the variance of gray values of embryo labels of two successive images is compared to identify movements. Therefore, a lag column is created and the difference of pixel across each video frame stamp is calculated using the image calculator node. Then a threshold is applied and the variance in pixel is extracted using the image segment features node for each labeled embryo.

This threshold was set by verifying the concordance between the final KNIME® output and the visual count of the STCs.

Embryo labels between subsequent frames were associated using the centroid of the label. Because embryos may slightly move between each frame, a distance of 15 pixels was allowed between label centroids of individual frames.

Finally the frequency of movements of each embryo is analyzed by iterating over each label and using as input the pixel variance over all the frames. An increase in variance indicates tail coiling. Therefore during the time series, peaks representing tail coilings were identified using the function 'findpeaks' of the R package 'quantmod' [12] embedded in the KNIME workflow by means of an R snippet node. Fig. 2e–f shows an example of a graph obtained and the identified peaks for each embryo. The STC frequency per minute is calculated taking into account the total duration of the video recordings and at the end, an Excel® file with the same name as the video is automatically saved with the output results.

Note that we included a metanode ("Check for error") after the "position binner" metanode. This node serves as an internal control to detect when there is an error during the image analysis, for example in case that embryo were not correctly identified and labeled. That would require to repeat the analysis of the specific video by adjusting the first threshold value (the one that allows identifying each individual embryo) or correcting the maximum distance of centroid allowed between individual frames.

Specific procedure

More details on how to implement the workflow are shown in the youtube video: https://youtu. be/wgJN71zTvRw

- (1) Download KNIME (https://www.knime.com/downloads) and install on your PC.
- (2) Also download the STC workflow and ffmpeg software from KNIME hub and import it into your KNIME software. Open the KNIME software and set the workspace to your preferred folder.
- (3) Install all necessary KNIME extensions (math formula, quickforms, community image analysis nodes, external tool node) for the STC workflow and restart KNIME.
- (4) Configure ffmpeg software by setting up the path to its location on your PC using the bin folder as the end of the path.
- (5) Open R software and install the required packages (quantmod, dpcR and Rserve). If necessary, change the file path of R to the correct location. R error messages can be diagnosed by clicking Eval script in KNIME and then installing the missing packages
- (6) The video file or folder containing the video files to analyze should be inserted in the KNIME workspace folder, use the Explorer browser node to select the folder containing the video. Alternatively, you can use the List files node to select folders outside of the workspace folder. Specific video files from the folder can be selected using the row filter node next to list files node.
- (7) The workflow can be executed by clicking the double green arrow in the top menu to start the loop.
- (8) The workflow creates a folder with the same name as the video file analyzed which contains the stack of images generated. After the analysis they should be removed to save disk space.
- (9) Changing KNIME parameters:
 - (a) Frames per minute can be changed in the ffmpeg component configuration and in the Frequency analysis component configuration. Default is set to 120 frames per minute. Both configurations should have the same frame rate for a correct analysis.
 - (b) R parameters for threshold and smoothing can be changed in the Frequency analysis component configuration. Default is set to 0.003 and 0.1 for threshold and smoothing respectively.
 - (c) Global threshold for detecting embryo can be changed by subtracting or adding a number in the Threshold component configuration. This controls the global threshold node.



Fig. 4. Smoothed and unsmoothed STC peaks. Unsmoothed peaks show the raw peaks without any processing and can be used to validate errors. The wide peaks could be due to fast multiple coils while the weak peaks could be due to movement of whole embryo.

Data treatment

Data was obtained from the KNIME workflow as the number of STCs per minute or STC frequency for one embryo. Fig 2f shows an example of the peak count of an embryo with 9 STC counts per min. The workflow automatically calculates the STC frequency per min based on the length of the video. However, it is also possible to manually calculate the STC frequency especially when a correction is required. A correction protocol may be implemented when the user makes observations that may potentially influence the outcome of the STC analysis i.e. uncontrolled events such as strong signal from movement of whole embryo, many weak peaks close to the peak defining threshold and inaccurate accountability of fast multiple peaks may influence the STC frequency.

Correction protocol

Inspect the peaks: A possible correction protocol could be to visually inspect the peaks for errors e.g. by comparing unsmoothed and smoothed peaks (Fig 4). Irregular shaped, wide peaks and very small peaks are suspects. For example, the suspected wide and weak peaks shown in Fig 4 can be confirmed by inspecting the unsmoothed peaks which display the shape of the erroneous peaks more clearly.

Suspect peaks: Suspected peaks should be verified using the annotated label of the embryo to locate and check embryo movement in the original video (Fig 5). The user would be able to identify errors without checking the original video after a period of video training to identify error peaks. A visual comparison of automated and corrected STC counts for control measurements in different independent experiments shows that the differences are not significant (Fig 6). Therefore, the results from the automated analysis may be used for fast screening of chemicals and correction may only be required for a thorough analysis such as mode of action identification analysis.

Data analysis

The STC frequency of the individual embryos, the mean of all embryos, the STC peaks and the annotated embryos are compiled as results within an output Excel file from the KNIME workflow. An example Excel file and corresponding video is given in the supplementary information (SI Excel file 1 and video 1). The mean STC frequency $(3.3 \pm 0.85/\text{min})$ for untreated embryos varied between independent experiments (Fig 6). To obtain comparable STC results for independent experiments of the same chemical, we had to normalize the STC frequency for different concentrations to that of the untreated embryos to obtain a normalized percentage mean STC frequency.



Fig. 5. Labeling and annotation of individual embryos. Labels can be used to identify embryos in the video to check for suspected erroneous peaks. Note: Labels in the excel sheet start from 0 while labeled images start from 1. Therefore, embryo 0 in the excel sheet will be embryo 1 in the labeled image.



Fig. 6. Comparison of automated and corrected STC counts for 100 independent control measurements. Each bar or peak represents the mean STC count for 20 embryos. Dark brown portion of the bars represent areas where automated and corrected counts are the same. Blue portion of the bar represents tests in which automated counts are higher than corrected while yellow portion represents tests in which corrected are higher. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Fig. 7. Concentration-response curves for abamectin, chlorpyrifos and pyraclostrobin. Y-axis represents spontaneous tail coiling normalized to control and X-axis shows the exposure concentration. Different symbols represent independent experiments. Upward curves indicate hyperactivity effect with respect to controls while downward curves indicate hypoactivity effect. Figures taken from [7].

To determine the actual effect of a chemical, it is possible to analyze the data using concentrationresponse modeling or hypothesis testing. We performed concentration-response modeling to estimate the EC_{50} – the concentration at which the percentage STC is half-maximum relative to the untreated embryos. Hypothesis testing may also be used when sufficient technical replicates are tested. Shapiro test and Bartlett test could be used to check for normality and homogeneity of variance, respectively. In case normality of the data is not met, non-parametric test such Kruskal-Wallis or Dunnet tests could be used to test for statistical differences between treatment groups. Statistical difference was considered when the *p*-value < 0.05.

Method validation

The STC test as devised in this study can be used to screen neuroactive chemicals based on the hyper and hypoactivity response of zebrafish embryos. In addition, the STC test may also be used to screen non-neuroactive substances assuming that behavior endpoints are usually more sensitive than lethality. The STC test method described in the current paper have already been applied to screen a range of 18 test chemicals with different modes of action [7]. Here we give 3 examples of chemicals with typical modes of action either with an expected hyperactivity or hypoactivity or without any expected effect.

Abamectin is an avermectin insecticide expected to cause hypoactivity by activating Gamma aminobutyric acid-gated chloride channel. Abamectin induced hypoactivity in the STC test at an EC_{50} of 0.055 μ M. Four other studies reported hypoactivity for abamectin in the STC test but the reported lowest observed effect concentrations (LOEC) were higher than the EC_{50} found in the current study [8,9,15,17]. This could be due to conducting exposure in plastic well-plates rather than glass as exposure vessel. The only study [8] that conducted exposure in glass had the least deviation (factor of 4) from our study. Abamectin is highly lipophilic (logDpH7.4(ACD/Labs) of 5.85) and hence has more affinity to bind to plastic than glass, therefore, abamectin may be more bioavailable to the embryos in a glass container leading to effects occurring at lower concentration. The use of a different endpoint (percentage of organisms showing hypoactivity) could be an additional reason for the deviations in effect concentrations [6]. The only study [17] that used the same endpoint (STC frequency) as in the present study had the second least deviation of a factor 6. Further, the analysis duration used in these studies were lower than the 1 min used in the present study and this could also be the cause for inconsistent effect concentrations.

Chlorpyrifos-oxon is a metabolite of chlopyrifos which is an organophosphate insecticide. It acts by inhibiting acetylcholinesterase enzyme which breaks down acetylcholine, and therefore keeps the nicotinic acetylcholine receptors open for sodium ions to flow into the cell leading to an action potential and hence potential hyperactivity. In our study, chlorpyrifos-oxon induced hyperactivity in the STC test at an EC_{50} and EC_{10} of 0.32 and 0.05 μ M respectively and this is consistent (the EC_{10}) with the LOEC of 0.03 μ M reported by Weichert et al. [17]. These effect concentrations are significantly lower (or more toxic) than that of the parent compound – chlorpyrifos which might be due to the limited bioactivation in the early stages of zebrafish embryo [7].

Pyraclostrobin is a fungicide and expected to not impact on the STC due to its classification as a narcotic or baseline toxic in quantitative structure and activity relationship (QSAR) for zebrafish [2]. Pyraclostrobin did not induce any effect in the STC test up to a concentration of 0.15 μ M and similar absence of STC effect up to 0.76 μ M were reported by [9]. Fig. 7 shows the concentration-response relationships for abamectin, chlorpyrifos-oxon and pyraclostrobin. These results validate the STC test method for screening chemicals.

Conclusion

In this paper, we described a protocol for measuring spontaneous tail coiling in zebrafish embryos. First, we gave exhaustive guidelines on how to conduct the experiment based on optimized experimental parameters. Second, we detailed how to automatically analyze the collected video recordings in a workflow with the open source KNIME software. Third, we then validated the described method using three chemicals with different modes of action. The STC test can now be used for the assessment of neuro (developmental) toxicity and testing of both neuro and non-neuroactive compounds. This automated analysis in KNIME provides an easier way to analyze STC over the laborious manual counting in [17]. The correction protocol utilized in the current study could enable more accurate estimation of the STC counts than other advanced behavioral tools that may not allow for real-time inspection and correction of STC peaks (eg. [9]). However, costume tools which are free and solely targeted at STC analysis are recently being developed. In this regard, the KNIME workflow developed in the current study alongside a MATLAB® tool [4] and an Image [macro [18] are the current available freeware for STC analysis to our knowledge. Due to video resolution of multi-well system, our STC assessment was developed for a microscope set-up which might reduce throughput. However, we are recently applying improved video resolutions and modified workflows to enable also the assessment of STC in multi-well plates (i.e. [14]). It is also important to recognize that the STC workflow presented in this article does not require an expensive imaging device and can be easily implemented with a camera mounted on a standard dissection microscope. This provides a costeffective solution for laboratories that would like to add a new, simple and sensitive method to their repertoire of testing tools.

Supplementary material and/or Additional information:

SI Excel file 1 – Result output of the STC analysis in KNIME. Sheet 1 ("default") contains embryo identification labels, total embryos analyzed and threshold of analysis. Sheet 2 ("Raw data") contains the STC peaks, peak number for each embryo and STC frequency.

SI Video 1 – Video recording of 20 embryos which was analyzed in KNIME to give the result output in SI Excel file 1.

Direct Submission or Co-Submission

Co-submissions are papers that have been submitted alongside an original research paper accepted for publication by another Elsevier journal

Co-Submission

NTT_106918

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Firstly, we would like to acknowledge the high-spirited patronage by the late Dr. Tamara Grummt throughout the whole project! We also want to acknowledge the financial support for AO. Ogungbemi and R. Massei by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the Neurobox Project (FKZ 02WRS1419F). In addition parts of the study were co-financed by the UFZ integrated project Exposome. Lastly, we highly acknowledge the help by Nicole Schweiger for fish culture and embryo production.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10. 1016/j.mex.2021.101330.

References

- [1] M.R. Berthold, N. Cebron, F. Dill, T.R. Gabriel, T. Kötter, T. Meinl, P. Ohl, K. Thiel, B. Wiswedel, KNIME-the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond, ACM SIGKDD Explor. Newslett. 11 (1) (2009) 26–31.
- [2] A. Birke, S. Scholz, Zebrafish embryo and acute fish toxicity test show similar sensitivity for narcotic compounds, ALTEX Altern. Animal Exp. 36 (1) (2019) 131–135.
- [3] D. Copmans, T. Meinl, C. Dietz, M. van Leeuwen, J. Ortmann, M.R. Berthold, P.A. de Witte, A KNIME-based analysis of the zebrafish photomotor response clusters the phenotypes of 14 classes of neuroactive molecules, J. Biomol. Screen. 21 (5) (2016) 427–436.
- [4] J. González-Fraga, V. Dipp-Alvarez, U. Bardullas, Quantification of spontaneous tail movement in Zebrafish embryos using a novel open-source MATLAB application, Zebrafish, 16 (2) (2019) 214–216.
- [5] C.B. Kimmel, J. Patterson, R.O. Kimmel, The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish, Dev. Psychobio. J. Int. Soc. Dev. Psychobiol. 7 (1) (1974) 47–60.
- [6] A. Ogungbemi, D. Leuthold, S. Scholz, E. Küster, Hypo-or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes, Environ. Sci. Eur. 31 (1) (2019) 88.
- [7] A.O. Ogungbemi, E. Teixido, R. Massei, S. Scholz, E. Küster, Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®, Neurotoxicol. Teratol. 81 (2020) 106918.
- [8] T.D. Raftery, D.C. Volz, Abamectin induces rapid and reversible hypoactivity within early zebrafish embryos, Neurotoxicol. Teratol. 49 (2015) 10–18.
- [9] T.D. Raftery, G.M. Isales, K.L. Yozzo, D.C. Volz, High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos, Environ. Sci. Technol. 48 (1) (2014) 804–810.
- [10] D.M. Reif, L. Truong, D. Mandrell, S. Marvel, G. Zhang, R.L. Tanguay, High-throughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes, Arch. Toxicol. 90 (6) (2016) 1459–1470.
 [11] H. Richendrfer, R. Creton, R.M. Colwill, The embryonic zebrafish as a model system to study the effects of environmental
- [11] I. Kelenkier, R. Creton, K.M. Colwin, The employmer 2-bransh as a model system to study the effects of environmental toxicants on behavior, in: Zebrafish, Nova Science Publishers, New York, NY, USA, 2014, pp. 245–264.
- [12] Ryan, J.A., Ulrich, J.M., Thielen, W. and Teetor, P., 2017. Quantmod: quantitative financial modeling framework. R package version 0.4-12.
- [13] L. Saint-Amant, P. Drapeau, Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo, J. Neurobiol. 37 (4) (1998) 622–632.
- [14] Teixidó, E., Klüver, N., Ogungbemi, A.O., Küster, E. and Scholz, S., in press. Evaluation of neurotoxic effects in zebrafish embryos by automatic measurement of early motor behaviours. Experimental Neurotoxicology Methods. Neuromethods Springer Nature, (in press).
- [15] S.M. Vliet, T.C. Ho, D.C. Volz, Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos, Toxicol. Appl. Pharmacol. 329 (2017) 241–248.
- [16] C. Wählby, I.M. Sintorn, F. Erlandsson, G. Borgefors, E. Bengtsson, Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections, J. Microsc. 215 (1) (2004) 67–76.
- [17] F.G. Weichert, C. Floeter, A.S.M. Artmann, U. Kammann, Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances-evaluation of a behavioral parameter in the embryogenesis of Danio rerio, Chemosphere 186 (2017) 43–50.
- [18] K. Zhang, J. Liang, N.R. Brun, Y. Zhao, A.A. Werdich, Rapid zebrafish behavioral profiling assay accelerates the identification of environmental neurodevelopmental toxicants, Environ. Sci. Technol. 55 (3) (2021) 1919–1929.

REVIEW

Open Access

Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes

Afolarin Ogungbemi^{1,2*}, David Leuthold¹, Stefan Scholz¹ and Eberhard Küster¹

Abstract

Tests with zebrafish embryos have gained wide acceptance as an alternative test model for drug development and toxicity testing. In particular, the behavioral response of the zebrafish embryo is currently seen as a useful endpoint to diagnose neuroactive substances. Consequently, several behavioral test methods have been developed addressing various behavioral endpoints such as spontaneous tail coiling (STC), photomotor response (PMR), locomotor response (LMR) and alternating light/dark-induced locomotor response (LMR-L/D). Although these methods are distinct in their application, most of their protocols differ quite strongly in the use of experimental parameters and this is usually driven by different research questions. However, if a single mode of action is to be diagnosed, then varying experimental parameters may cause incoherent behavioral responses (hypo- or hyperactivity) of zebrafish during toxicity assessment. This could lead to inconclusiveness of behavioral test results for use within a prospective and diagnostic risk assessment framework. To investigate the influence of these parameters, we conducted a review of existing behavioral assays to address the following two questions: (1) To what extent do varying experimental parameters influence observed effects in published behavioral test methods? (2) Is the observed behavior change (hypo- or hyperactivity) of zebrafish embryos consistent with the expected mode of action of a chemical? We compiled a set of 18 substances which are anticipated to be neuroactive. We found that behavioral changes are not only affected by chemicals but also variation in the use of experimental parameters across studies seems to have a high impact on the outcome and thus comparability between studies. Four parameters, i.e., exposure concentration, exposure duration, endpoint parameter and developmental stage were the most influential parameters. Varying combinations of these parameters caused a non-reproducible outcome for the hyperactivity expected for the organophosphates; chlorpyrifos and diazinon. We highlighted that the STC test shows a higher capacity to predict the hyperactivity of organophosphates, while PMR and LMR-L/D were more suitable to predict the hypoactivity expected for anticonvulsants. We provide a list of recommendations which, when implemented, may help to exclude the risk of bias due to experimental parameters if similar goals are desired.

Keywords: Neurotoxicity, Activity, Hypoactivity, Anticonvulsants, Acetylcholinesterase inhibitors, Pesticides, Pharmaceuticals, Behavioral ecotoxicology, Risk assessment

*Correspondence: afolarin.ogungbemi@ufz.de

¹ Dept. Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental

Research-UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Background

Many chemical substances released into the environment exhibit neuroactive properties and may have negative consequences on human and environmental health [67]. In fact, most of these substances are designed to interact with the nervous system. For example, insecticides target the nervous system of invertebrates, while some pharmaceuticals are designed to treat neurodegenerative diseases in humans [26, 107]. Although chemical monitoring techniques are commonly used, a holistic approach for risk assessment requires appropriate effect-based tools to detect neurotoxic effects [11]. Busch et al. [15] showed that neuroactive substances represent the largest group (13%) of chemicals with known mode of action (MoA) detected in European rivers. These neuroactive substances co-exist in the environment with other chemicals [67] and substance-receptor relationships could be useful to identify these neuroactive substances within a complex mixture. Typically, neuroactive substances target specific parts of the nervous system such as acetylcholinesterases (AChE), nicotine receptors (nAChr), gamma-aminobutyric acid receptors (GABA) and sodium channel receptors. Despite the widespread occurrence of neuroactive chemicals in the environment and their ability to disrupt the nervous system, standardized methods for assessing the risks of these substances are lacking [66]. Hence, we conducted a review of the commonly used behavior test methods in zebrafish embryo which are used to assess neurotoxicity. We collated behavior testing of 18 substances from different studies. This review evaluates thecomparability of the experimental parameters used in these studies as a means to optimize them for assessing and detecting neuroactive substances within a prospective and diagnostic risk assessment framework.

Importance of zebrafish embryo behavior

Testing of the adverse effects of chemicals to humans and the environment relies at present to a large extent on animal models such as rodents and adult fish [72]. It is, however, known that the exposure of animals to chemicals may inflict pain and distress. Hence, there is an increased need to develop alternatives to animal tests because of ethical reasons, as well as to reduce time and cost of these tests [12, 29]. Consequently, the use of animals in toxicity testing has been highly discouraged in favor of promoting the 3R principle: reduction, refinement and replacement [33, 96]. In turn, the use of cell lines is encouraged as an alternative due to their ability to identify mechanisms underlying toxic effects [100]. However, the inability of cell lines to integrate the interaction of various tissues within a multicellular system is a major disadvantage [102]. Alternatively, zebrafish embryos proved to be a promising model due to its capacity to predict fish and rodent toxicity [47, 103]. Further, the behavior of zebrafish embryos can be used to distinguish between different neurotoxic MoA such as beta-adrener-gic receptor agonists, dopamine agonists and adenosine receptor antagonists [60].

In fish, functional interference with the cardiovascular and nervous system, particularly demonstrated for AChE inhibition, leads to the respiratory failure syndrome resulting in enhanced mortality due to oxygen limitations [97]. In contrast, fish embryos appear to lack the respiratory failure syndrome because oxygen in embryos is mainly supplied via skin diffusion [59, 95]. As a result, embryos only show a weak mortality for neurotoxic substances. However, it has been shown that some neuroactive substances exhibit effects on behavior at concentrations well below the lethal range [59]. Hence, the observation of behavior changes at sublethal concentration ranges in embryos may provide an indicator for neuroactivity and/or could be used to infer adverse effects. Therefore, the aim of this review is to identify experimental parameters for behavior assays that could support the unbiased diagnosis of different neuroactive mode of actions.

Types of behavioral tests considered in this review

The potential to identify interactions of chemicals with the nervous system using behavioral assays in zebrafish has been recognized and several behavioral test methods have been developed. In this review, we focus on the most commonly utilized tests and their endpoints including spontaneous tail coiling (STC), photomotor response (PMR), locomotor response (LMR) and alternating light- and dark-induced locomotor response (LMR-L/D) (Table 1).

Spontaneous tail coiling (STC) is the first motor activity generated by the developing neural network which occurs as a result of the innervation of the muscle [58]. This event is assumed to be important for the hatching of the embryo from its chorion but evidence for a role of STC for hatching has not yet been provided [58, 98]. Frequency changes of the STC have been used as a tool to detect the effects of neuroactive chemicals in developing embryo [118, 121].

The photomotor response (PMR) is an embryonic movement induced by a high-intensity light stimulus (wavelength between 300 and 700 nm). This response is independent from light perception by the eyes and mediated through photoreceptors in the developing hindbrain [60, 89]. The PMR can be divided into four broad phases, a pre-stimulus background phase, latency phase, excitation phase and refractory phase. The visualization of

	Spontaneous tail coiling test (STC)	Photomotor response test (PMR)	Locomotor response test (LMR)	Alternating light- and dark-induced locomotor response test (LMR-L/D)
Applied stimuli	Non	High-intensity light	Non	Alternating light/dark
Endpoint	Number or frequency of tail coilings	Movement activity or motion index	Swimming dis- tance, duration, and speed	Swimming distance, duration, and speed
Exposure duration	0–28 hpf	0–42 hpf	0–120 hpf	0–120 hpf
Age of embryo at time of measurement	19–28 hpf	28–42 hpf	72–120 hpf	72–120 hpf

Table 1 Characteristics of different behavioral tests

these PMR phases has been used for chemical classification and drug screening [60]. Both STC and PMR represent endpoints measured in pre-hatching embryo stages (19–42 hpf) of zebrafish.

The locomotor response can either be spontaneous (LMR) or induced with alternating light/dark periods (LMR-L/D) and these can be measured in the post-hatching embryo stages (>48 hpf) of zebrafish. In LMR-L/D, zebrafish embryos exhibit weak movement when illuminated by light but exhibit an increase in activity when switched from light to dark [52, 106]. Therefore, lightdark cycles are applied to monitor this behavior. LMR is estimated by recording various swimming activity endpoints such as swimming time, swimming distance, swimming speed (calculated from distance and time) and swimming angle, while LMR-L/D measures the stated parameters under alternating light/dark cycles. The LMR assessment is similar to behavioral monitoring studies that use adult fish, e.g., for online (bio-) monitoring of waste- or surface water, also known as "fish toximeters". In these toximeters, for example, alteration of swimming activity is often used as an indicator of potential adverse effects due to chemical exposure [3].

Influence of experimental parameters

Although these behavioral test methods, particularly LMR and PMR, are widely used and have been applied in large drug and chemical screens [14, 89], they differ largely in experimental parameters between different labs such as exposure duration, selection of endpoint parameter, etc. Several authors have studied the influence of experimental parameters on zebrafish embryo behavior. For example, distance moved by zebrafish embryo varies with age of embryos and size of exposure vessel [27, 82]; light/dark response is usually affected by duration of cycles and the number of repeats [76]; and the observed effect is highly dependent on the exposure concentration or endpoint selected [27, 50]. Legradi et al. [66] reviewed the literature to compare behavioral test methods. They found that for LMR assessment,

experimental parameters such as duration of behavior assay and developmental stage of embryos varied significantly among studies. It is still largely unknown how this variability influences the outcome of behavioral studies. The need to harmonize and report experimental parameters has previously been discussed for zebrafish embryotoxicity test [8] and in vitro neurotoxicity testing [23]. However, such critical discussion and analysis for neurotoxicity testing using zebrafish embryo behavior are still lacking.

The use of hypo- and hyperactivity as a predictor

In some studies, the differentiation between hypo- and hyperactivity has been suggested as a potential indicator for neuroactivity MoA [31, 38, 60]. With respect to embryonic behavior of unexposed embryos, hypoactivity refers to a decrease in the spontaneous or induced movement of embryos, while hyperactivity refers to the opposite. In this study, we define neurotoxicity as an interaction of a substance with the nervous system primarily leading to a structural change (e.g., axonal deformation or inhibition of neurite outgrowth), while neuroactivity is a functional interaction with specific nervous receptors leading to a change without necessarily being accompanied by structural changes (e.g., alteration of neurotransmission or blockage of nervous receptor). Nonetheless, neuroactivity may lead secondarily also to structural and morphological changes over a longer duration or higher concentration of chemical exposure. It is assumed that neuroactive substances are able to modulate nervous receptors leading to hypo- or hyperactivity behavior [114]. For example, Vliet et al. [118] used the STC response as a metric to screen a library of 1280 pharmacologically active compounds for neuroactivity. Reif et al. [89] used the hypo- or hyperactivity observed in the different phases of the PMR to characterize a suite of 1060 chemicals; and Bugel and Tanguay [14] were able to negate a GABA mode of action for a suite of 24 flavonoids in the LMR based on the induction of hypo- or hyperactivity.

The rationale behind the above-mentioned screening studies was that substances with the same or similar mode of action would only induce either hypo- or hyperactivity. However, it is also possible that both hypo- and hyperactivity (biphasic activity) may be induced by the same substance depending on the concentration level or duration of exposure. For example, chlorpyrifos-oxon and aldicarb-sulfoxide stimulate nerve cells by inhibiting acetylcholinesterase, thereby inducing hyperactivity and increased heartbeat of embryos, respectively [62, 120]. At higher concentrations, the over-excitation of the cholinergic system may result in paralysis caused by seizures and thus leading to hypoactivity [111]. Alternatively, abamectin induces hypoactivity due to its inhibitory action when it activates the GABA-gated chloride channel [87]. Such distinct characteristics of neuroactive substances suggest that the hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos may be used to identify MoA when experimental parameters are adequately controlled [6].

Aims and approach of this review

We aimed to investigate the influence of experimental parameters on the hypo- or hyperactivity response of zebrafish embryos by reviewing existing literature. We first created a collection of pharmaceutical and pesticide substances with known MoA, for which sufficient information on effect concentrations and experimental parameters were available, to address the following questions:

- 1. Which experimental parameter(s) mostly influence the observed effects in the four above-mentioned behavioral test methods and is it possible to rank these parameters?
- 2. How often is the observed hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos in literature consistent with the expected mode of action of a chemical substance?

These questions are based on the hypo- or hyperactivity hypothesis, i.e., whether the behavioral response (hypo- or hyperactivity in moved distance, tail coiling or else) of zebrafish embryos predicts the mode of action of a neuroactive chemical and vice versa. This review provides information that will support the selection of a combination of appropriate behavioral tests within a prospective risk assessment framework. We also present critical evaluations on how to use hypo- and hyperactivity detection as a tool to improve the identification of neuroactive mode of action in a complex mixture within a diagnostic risk assessment framework.

Literature selection

Literature search was mainly undertaken by searching the "web of science" database (http://www.webof knowledge.com) and the search results were filtered in a KNIME[®] (http://www.knime.com) workflow. A few additional papers were selected by cross-referencing of citations. Figure 1 shows a summary of the literature selection procedure.

- Keyword search on "web of science" database: The following keywords combinations were searched for representation in either title, abstract or keywords: ("zebrafish embryo" OR "zebrafish larvae" OR zebrafish) AND (*throughput* or locomotor OR LMR OR "spontaneous activity" OR STC OR Photomotor OR PMR) AND (behav* OR hyperactivity OR hypoactivity OR neurotoxicity OR movement). Only studies published between the years 2000 and 2018 were retrieved. The search was conducted on 17th August 2018. The search was repeated on 29th July 2019 to include additional hits of chemicals that were already included in the analysis.
- 2. Apply exclusion criteria by screening the abstract of the study hits: The following exclusion criteria were



applied to reduce the variability between studies and to increase the quality of data collection.

- a. Organism: Not zebrafish, or a mutant zebrafish strain was used.
- b. Age: Juvenile or adult stages were tested.
- c. Method: Other assays than STC, PMR, LMR and LMR-L/D were used.
- d. Chemical: Only a mixture, an inorganic compound or a natural, undefined product was used.
- e. Exposure: Oral exposure
- f. Effect: No report or indication of hypo- or hyperactivity.
- 3. Regrouping of study hits into chemical hits:
 - a. A KNIME[®] workflow was used to aggregate and regroup the study hits according to the test chemical. The KNIME[®] workflow is shown in Additional file 1: Figure S1.
 - b. The KNIME[®] workflow was also used to exclude chemicals with less than 3 entry hits
- 4. A further exclusion criterion was applied to the chemical hits to increase the quality of the collected data; i.e., chemicals with unknown or unclear mode of action were excluded.

Data collection and analysis

After selecting the appropriate studies based on the criteria above, we proceeded to analyze data reported in these studies. Data collected included: chemicaltype, mode of action, effect concentration (for hyper- and hypoactivity), exposure duration, analysis duration, exposure well size, developmental stage at exposure, zebrafish strain, etc. The full raw data collected are available in Additional file 2: Excel sheet 3.

Results and discussion

In the first part of the results, we address the question which experimental parameters are mostly influencing toxicity outcome of behavioral tests and we considered parameters related to exposure design and effect measurement for this analysis.

In the second part of the results, we address the question—how often the observed hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos after exposure to a chemical is consistent with the expected mode of action of this chemical. We compared observed and expected activities at three levels:

- a. Individual chemical comparison, i.e., individual chemicals were selected and the found literature results were compared on the level of observed behavior effect;
- b. Chemical class comparison, i.e., do organophosphates, for example, always show the same activity change in all behavior assays, even if test parameters were different;
- c. Behavioral method comparison, i.e., whether different behavioral test methods or contrasting experimental parameters give similar results?

For the ranking of the influence of each parameter, we analyzed the percentage concordance of hyperactivity between expected and observed activity for each behavioral test method. This was estimated by dividing the number of studies in which hypo- or hyperactivity was observed by the total number of studies for a certain chemical expected to cause hypo- or hyperactivity. Any observed non-concordance was attributed to experimental parameters as a risk of bias factor.

Influence of experimental parameters on behavior analysis

Thirteen experimental parameters were identified in the literature survey with potential impact on the outcome of different behavior tests. The parameters were subgrouped into biological (or intrinsic) and technical (or extrinsic) experimental factors. Developmental stage, zebrafish strain, malformations, rearing conditions, time of day for behavior analysis and the selected endpoints were considered as biological factors. Exposure duration, exposure concentration, duration of behavior analysis, exposure well size, material used for exposure vessel, light conditions and solvent concentration were considered as technical factors. Table 2 shows the potential influence of the 13 experimental parameters which are more precisely explained in the text below.

Biological (intrinsic) factors Developmental stage

Padilla et al. [82] investigated the influence of development stage on distance moved in alternating light and dark periods. They compared the behavior of 4-, 5- and 6-day-old non-exposed embryos/larvae in the light period and found that older embryos had increased movement, indicated by the distance moved, than younger ones. On the other hand, the influence of age in the dark period was not obvious except for differences in the pattern of movement. The observed influence of age on behavior in the light period may be due to differences in retinal maturation as the retina ganglia cells of younger larvae may not respond to light as much as older larvae

Parameter type	Parameter	Influence on	Potential measures to exclude bias
Biological or intrinsic	Developmental stage	Biotransformation, effect concentration, receptor availability stage specific behavior	Unify developmental stage for comparability; report on incubation temperature
	Time of day	Performance of control group, test sensitivity	Measure behavior at similar time of the day
	Developmental malformations	Effect concentration, effect direction (hypo- or hyperactivity), swimming ability	Malformations should be analyzed in parallel with behavioral testing to indicate at which concentration they may contribute to the observed behavioral effects
	Endpoint parameter	Effect concentration, effect direction (hypo- or hyper-activity)	Compare the same endpoints within a particular assay, i.e., distance moved for LMR and frequency for STC
	Rearing conditions during exposure	Performance of control group, test sensitivity	Report all rearing conditions
	Zebrafish strain	Control performance, test sensitivity	Consider strain effects during result comparison and interpretation
Technical or extrinsic	Exposure concentration	Effect concentration type (LOEC versus ECX) and accuracy, effect direction (hypo- or hyperactivity)	Avoid single concentration and include a full concentration- response analysis
	Exposure duration	Effect concentration, Internal bioavailable concentration, biotrans- formation, effect direction (hypo- or hyper-activity), observation of (neuro)developmental effects	Consider toxicokinetics/toxicodynamics and its influence on chemi- cal concentration during test design
	Duration of behavior analysis	Performance of unexposed group, test sensitivity	Differences in the duration of light-dark cycles may impact the sensitivity and outcome in LMR-L/D
	Exposure well size	Effect direction (hypo- or hyperactivity), Performance of control group, test sensitivity	Select and use exposure wells of same dimension for reproducibility, i.e., 96 wells for neurotoxicity testing and 24 wells for diagnosing neuroactivity MoA
	Material used for exposure vessel	Effect concentration, test sensitivity	Avoid plastic for lipophilic chemicals, measure/predict exposure concentration and install measures to ensure a stable exposure concentration if required.
	Light conditions	Performance of unexposed group, test sensitivity	Light intensity, duration, and sequence of photo stimuli should be reported
	Solvent concentration	Exposure concentration, side effects	Avoid DMSO and other solvents or use 0.01% concentration when necessary. Test solvent control

Table 2 Summary of the Influence and optimization of experimental parameters on behavioral test performance

[82]. These findings are corroborated by De Esch et al. [27], who compared 5-, 6- and 7-day-old embryos/larvae and Leuthold et al. [68] who compared 4- and 5-day-old embryos. Fraser et al. [38] reported increased movement for older embryos (120>100>96 hpf) when raised in constant darkness. In contrast, Ingebretson and Masino [50], while considering total distance moved in constant light, reported that 7-day-old larvae moved less than 4-day-old embryos. However, the impact of age on the distance moved was only observed when embryos were analysed in deep but not in shallow wells. The developmental stage may not only impact the control behavior but also can impact the observed responses to exposure of chemicals that require biotransformation such as organophosphates [61]. Furthermore, some neurotransmitters such as histamine and 3-methoxytyramine may not be present in early developmental stages and this could lead to differences in observed effects due to target availability [94, 116]. Principally, differences in the uptake kinetics of chemicals may also impact the behavior at specific developmental stages. However, so far, there is weak evidence for considerable uptake differences [78]. Nevertheless, for pre-hatched stages and high-molecularweight compounds, the chorion may represent a barrier [84, 102]. These findings indicate that the developmental stage at which the analysis is conducted may be influential. Relative effects by chemicals may not necessarily be disturbed if they are measured at the same stage.

Time of the day for analysis

Kristofco et al. [61] investigated the influence of daytiming on behavior analysis in alternating light/dark test (LMR-L/D). They found that activity of embryos and larvae measured daily (between 4 and 10 dpf) were significantly lower in the early hours of the day at 9 and 10 a.m. and more variable during these periods, while activity was higher and less variable in the afternoon. In contrast, MacPhail et al. [76] measured locomotion and reported higher movement for 6 dpf larvae at 10 and 11 a.m. in the morning, while lower movement was recorded in the afternoon. The two studies used the same 14/10 light/ dark cycle. MacPhail et al. [76] recorded behavior only for the dark period. Both authors concluded that activity was less variable when measured in the afternoon. In contrast to both studies, Fitzgerald et al. [37] reported that time of day did not change the activity of 5, 6 and 7 dpf larvae in the dark period of LMR-L/D measured at 9 a.m and 2 p.m., and activity was more variable in the afternoon rather than in the morning. However, a different temperature (26 °C versus 28 °C of the other studies) was used as rearing temperature and the controversial finding may have been caused by differences in growth and developmental stage. Furthermore, the influence of day-time may rather relate to the time after the onset of light, but details on light cycles are missing in some articles. These results suggest that diurnal rhythm of fish embryos and the impact on responses may have to be controlled by measuring behavior at similar time of the day, and that impacts of growth and developmental as potential confounding factors should be considered.

Developmental malformations

Padilla et al. [82] reported that malformed zebrafish in control solution showed hypoactivity in both light and dark periods, while healthy control animals remained unaffected in behavior. Hence, reduced movement of activity may represent a secondary effect following malformations when embryos are exposed to chemicals. Consequently, malformations should be analyzed in parallel and concentration–response data for phenotypic effects and behavior should be compared to identify potential secondary effects. By comparing the effect concentration for behavior and malformation, the specificity of the behavioral effects could be assessed. However, subtle alterations at sub-organism level (e.g., muscle structure) not easily detectable by microscopical observations may also impact the behavior.

Endpoint parameter

De Esch et al. [27] compared three different endpoints in LMR-L/D, namely distance moved, duration of movement and swimming velocity (calculated from distance and time), among three different developmental stages. They found that results for swimming velocity were negatively correlated with the other endpoints, i.e., high velocity was correlated with lower distance moved and shorter duration of movement. This was attributed to the fact that the increased velocity was caused by short movements and hence, only a short distance was moved. Therefore, they concluded that endpoints should be selected cautiously since swimming velocity might not completely represent other endpoints. Alternatively, Ingebretson and Masino [50] advocated the use of more than one endpoint as an integrated approach to maximize diagnostic capacity of behavioral activity. In the case of STC, two different endpoints were typically reported; frequency of STC and percentage of embryos showing spontaneous activity [86, 126]. Since the latter endpoint only reveals the numbers of embryos showing STC, it may not be able to demonstrate effects that mainly affect the frequency of STC. For comparative assessment, the same endpoint parameter within a particular assay, i.e., distance moved for LMR and frequency for STC test should be used.

Rearing conditions

Rearing conditions may also be considered as an extrinsic technical factor. However, since rearing conditions (raising and/or exposure in groups versus raising of individuals, choice of rearing temperature) are known to impact the development in general and behavior patterns, it was formally considered as intrinsic factor. Zellner et al. [127] observed that zebrafish embryos raised in groups were more active than those raised individually after the first 5 days of development. They proposed that rearing condition before behavior measurements could probably influence the effects of exposure to neuroactive substances. This seems consistent with the knowledge that swarm fish like zebrafish show shoaling and schooling and this (i.e., raising as a group) decreases their overall stress level under certain conditions [88]. This peer inclusion has also been reported to increase stimulation and may facilitate neuron connection [65]. A guidance document on fish rearing delineates the density as being important [64] but at the moment, it is not clear whether crowding is important for early stages of zebrafish and what group size would be the appropriate rearing size [83, 91]. However, when embryos were exposed to valproate by Zellner et al. [127], hyperactivity was recorded but no significant difference was observed for embryos raised singly or in-groups. Whether embryos were exposed singly or in-groups may also impact the results due to the requirement for different types of data analysis; e.g., individual tracking of movement is difficult when exposure is conducted with group of animals.

Rearing temperature represents an important factor as well since it influences the rate of development, and therefore the developmental stages at which behavior may be analyzed [57]. Other rearing conditions such as pH and salinity which could also impact the behavior analysis were not discussed due to insufficient data or lack of reporting. Therefore, it is recommended to report specific rearing conditions.

Zebrafish strain

In the literature, a discussion is ongoing whether different zebrafish strains may differ in their susceptibility to chemicals and how much is based on genetically based differences, physiological adaptations to cultivation or other parameters [28, 45]. For behavioral effects, De Esche et al. [27] investigated the influence of different strains (TL and AB) on locomotion in alternating light and dark periods. They found significant differences in distance moved but only in the dark periods. Lange et al. [63] also compared five different strains of 6 dpf larvae (AB, TU, WIK, Casper and Ekkwill) and found that Casper and Ekkwill strains moved less than the other strains. They also compared AB strains from different laboratories and their results show that these AB strains moved similar distances but had different swimming times. They concluded that the strain might influence locomotor activity of zebrafish. Similarly, Liu et al. [73] reported behavioral differences of strains (TL, TLAB and AB) when measuring locomotion during abrupt changes in light cycles. Strain differences were also found in a study on survival and neurocranial effects of ethanol [75]. Further, strain differences have been reported during chemical exposure. 5D strain exposed to haloperidol showed hyperactivity, while the AB strain showed no effect [81]. These differences in strain behavior are probably related to genetic differences; albeit, the factors and differences leading to strain variability have not yet been identified. Hence, the possible influence of different strain or similar strain between different laboratories on zebrafish behavior should be considered.

Technical (extrinsic) factors Exposure concentration

Exposure concentration is obviously one of the most important experimental parameters in toxicity studies. Hamm et al. [46] identified that the renewal or nonrenewal of exposure solution could influence toxicity testing, particularly in case of volatilization, degradation and/or adsorption to exposure vessels, resulting in a decline of exposure concentrations. The exposure concentration could represent a factor of high relevance in high-throughput studies that only examine a single, selected concentration for a given test chemical. Depending on the selected concentration, hypo- or hyperactivity may be provoked and this can have an impact on diagnostic patterns if obtained with a single or a limited range of concentrations. For example, ethanol causes hyperactivity at concentrations below 2% and hypoactivity at concentrations above 4% [27, 52]. Zebrafish exposed to the cholinesterase inhibitor paraoxon showed hyperactivity in a lower exposure range (31-500 nM) and became hypoactive with a 100-fold increase in concentrations $(3.1-50 \ \mu\text{M})$ [86, 126]. The differential response may be associated with excitation of nerve signaling at lower concentrations due to acetylcholinesterase inhibition and seizure-driven paralysis at higher concentrations [111]. However, organophosphates have also been shown to affect axonal morphology of motor neurons at high concentrations (> 500 nM) [123] and this could probably explain the hyperactivity observed at low concentrations rather than hypoactivity [126]. Therefore, behavioral tests should include a concentration-response analysis.

Exposure duration

In a STC study by Vliet et al. [118], exposure duration was reduced from 23 h (2-25 hpf) to 2 h (23-25 hpf) to

eliminate false positives associated with malformations. This decreased the number of STC hits from 43 to 15. However, this decrease in hits could be compromised by a slow uptake of certain chemicals. Internal exposure analyses have indicated that for many chemicals, time to equilibrium with average internal concentrations can exceed 24 h depending on the compound's characteristics [13]. In behavior assays, that allow longer exposure durations such as the LMR, the same exposure concentration that causes hyperactivity in the STC may lead to axonal defects, malformations and/or paralysis resulting in hypoactivity in these long duration tests [61]. This could explain the opposite effect direction observed in STC tests (hyperactivity) and LMR tests (hypoactivity) for chlorpyrifos [120]. For similar reasons, differences in the effect direction (hypo- or hyperactivity) may also be observed within the same assay when different exposure durations are used. For instance, Leuthold et al. [68] have applied a 24-h exposure regime in the LMR-L/D and differences to studies conducted with longer exposure durations may be associated with the factor described above. This means that significant differences in exposure duration could influence the internal concentration of a chemical. Hence-if that is a possible confounding factor for the goal of the experiment, behavioral test designs should ideally measure or try to model the toxicokinetics/toxicodynamics of the chemical for appropriate result interpretation, e.g., short duration for identifying neuroactivity MoA, while long duration may be preferred for assessing developmental neurotoxicity.

Duration of behavior analysis

Zebrafish embryos are sensitive to alternating light/dark periods. Non-exposed zebrafish were found to be more active in dark than light periods. Therefore, by purpose, various studies have utilized cycles of light and dark periods to improve detection of hypo- and hyperactivity (e.g., [52, 61, 68, 129]). However, the dynamics of analysis duration has been shown to affect test outcome. Exposing 6 dpf larvae after a dark acclimation period of 10 min and a subsequent extended (40 min) period in light (or dark) showed contrasting behavior-activity increased to a maximum in the 10-min dark acclimation period, followed by a decline which continued to either a stable low level in the subsequent dark period or to a stable high level in the light period [76]. Interestingly, in a light/ dark preference test by Steenbergen et al. [110], zebrafish prefer light and the increased movement in the dark is hypothesized to relate to a behavior such as escaping from a predator [27]. Alternately, it was discussed that foraging in zebrafish depends on their visual system to find food, and therefore increased activity in the dark may be related to a light-searching behavior [48]. For toxicity tests, the basal activities during light and dark periods are important to detect hypo- and hyperactivity. While it might be difficult to detect hypoactivity in light periods given the low activity level, detection of hyperactivity could be more relevant during this period. The duration and frequency of light/dark cycles could also be of high relevance in a toxicity testing setup. Dark acclimation of zebrafish (10 min), followed by different light periods of either 5 or 15 min, showed a higher magnitude of increased activity in the subsequent dark period for the larvae exposed to 15-min light than that of 5 min [76]. Different dark acclimation periods of 10 and 20 min did not affect activity in subsequent light and dark periods. Another study by Liu et al. [73] found that analysis of short periods of 30 s before and after light/dark transition amplified behavior changes. Taken together, these results suggest that extended periods of light or dark can impact the activity of zebrafish embryos and hence may affect the sensitivity and outcome of the study.

Exposure well size

Velki et al. [117] compared the total distance moved for zebrafish embryo/larvae exposed in 24- or 96-well plates in the dark period. They reported an average distance of 600-700 mm moved in 24-well plates, whereas those in 96-well plates moved 40% less. Similarly, Padilla et al. [82] found that larval movement was approximately 4 times higher in 24-well than in 96-well plates and distance moved in 48-well plate was not statistically different from that of 96-well plate. They elucidated that the distance moved is mainly influenced by the circumference of the well rather than the area since embryos tend to swim more around the circumference of the well [20]. In contrast, Ingebretson and Masino [50] found no difference in distance moved when different well diameters of 12, 20 and 30 mm were compared [approximately referring to the diameter of 48- (10.9 mm), 24- (15.5 mm) and 6-well plates (35 mm). A potential bias by rearing conditions can probably be excluded since embryos were raised and tested in the same wells in Padilla et al. [82] but transferred to well plates after exposure for behavioral analysis in all other studies.

From the analyzed literature, it is not yet clear if the decreased distance in smaller wells is associated with a lower sensitivity of the assay. For test reproducibility and uniformity, it is recommended to use exposure wells of same dimension. As an alternative, one could conduct experiments in different well sizes to ensure maximal confidence of the sensitivity of the assay used.

Light conditions

Padilla et al. [82] investigated the influence of light intensity on the behavior of 6 dpf zebrafish larvae. They found an increased activity when light levels were decreased and this increasedactivity was dependent on the magnitude of the decreased light intensity. Therefore, light intensity, duration, and sequence of photo-stimuli should be recorded in different experimental setups and their impact on the effects obtained by exposure of chemicals should be investigated.

Material used for exposure vessels

The sorption of lipophilic substances to plastic material used for exposure is well known [36, 104]. Sorption could decrease the exposure concentration leading to underestimation of effects if based on nominal concentrations. Raftery et al. [86] exposed embryos to the highly hydrophobic glutamate channel blocker-abamectin. They found an effect concentration for the spontaneous tail coiling (STC, conducted in 384-well plates) which is 12-fold higher than that reported in a subsequent study [87] in which embryos were exposed in glass beakers (both used nominal concentrations). Similarly, Vliet et al. [118] who also exposed embryos to abamectin in 384-well plates found an effect concentration which is 6 fold higher than that observed in Raftery and Volz [87]. Beside the test container material, the ratio of surface area to volume could also induce variability. The reported effect concentration for emamectin is over 40 times lower when embryos were exposed in 24-well plates [121] compared to exposure in 384-well plates [86]. This could be the result of higher well absorption area with respect to volume in 384-well plates leading to higher adsorption. Hence, as would be appropriate for any other test and endpoint, the sorption of chemicals to exposure vessels should be considered by: (1) determining or predicting the real exposure concentration; and (2) estimating a possible loss of the chemical instead of using nominal concentrations only [35, 43, 44].

Solvent concentration

Solvents such as dimethyl sulfoxide (DMSO) are often used to accelerate dissolutions or to store stock solution for toxicity tests. At high concentrations, solvents may also impact the uptake of chemicals and provoke toxicity. Therefore, OECD guidance for aquatic toxicity tests recommends using a maximum solvent concentration of 0.01% (v/v). In concordance with these recommendations, Kais et al. [55] reported that DMSO concentration of 0.1% and 1% increased uptake of hydrophobic dyes into zebrafish embryos, while 0.01% had no effect. DMSO has also been found to increase the movement of 24 and 144 hpf embryo/larvae at 0.1 and 0.01%, respectively [19, 49]. These results showed that DMSO may be a source of confounding effects in behavioral tests. It is highly recommended to avoid solvents, but if necessary, Page 10 of 26

a solvent control should always be utilized and a range of solvent concentrations could be tested to characterize and exclude possible confounding effects.

Summary of influence of experimental parameters

The studies cited above showed the possible impact of different biological and technical experimental parameters on the behavioral response of zebrafish exposed to a chemical. Thus, experimental parameters may influence changes in behavior induced by chemicals. We ranked the importance of experimental parameters based on the frequency at which they explained inconsistencies (risk of bias factors) in chemicals as follows (Fig. 2): exposure duration (11) > exposure concentration (10) > endpoint parameter (8) > developmental stage (7) > light conditions (2) > material used for exposure vessel (1) = exposure well size (1) = duration of behavior analysis (1) = zebrafish strain (1). This ranking does not consider the behavioral test method as a factor.

Depending on the goal of the research question, the reproducibility of behavioral tests may be improved by developing protocols with harmonized experimental parameters. However, while there is evidence for the impact of intrinsic and extrinsic parameters affecting behavior, only few studies have conducted a systematic assessment on how this may impact the detection of chemical effects. One of such studies found that developmental stage, light conditions during rearing and size of well plate affected the locomotor response of zebrafish larvae exposed to bisphenol A and tetrabromobisphenol A [38]. Although the evidence that effects of exposure to chemicals may not be detected due to the choice of experimental parameters is not clear, the observed effects in unexposed groups are sufficient to motivate the harmonization of behavioral tests for specific hypotheses.

Comparative assessment of observed activity (hypo- and hyperactivity) in zebrafish and expected activity based on mode of action of chemicals

The review above describes the influence of biological and technical factors on behavioral assays. This outcome was then utilized to prioritize which experimental factors may be considered to influence results when comparing observed activity in zebrafish to expected activity based on relation to the mode of action (MoA). Therefore, a collection of publications was analyzed with respect to chemical type, mode of action, effect concentration (for hyper- and hypoactivity), endpoint parameter, exposure duration, duration of behavior analysis, exposure well size, developmental stage at exposure and zebrafish strain used in zebrafish embryo behavior tests. Figure 1 shows the flowchart that



summarizes how the collected papers were processed. In the first step, 885 studies were obtained in the "web of science" search and these were reduced to 111 studies (Additional file 2: Excel[®] sheet 1) after a manual abstract screening process based on the exclusion criteria. Second, the study hits were transformed through a series of aggregation and regrouping processes (to exclude chemicals with less than 3 study hits) in KNIME[®] to obtain 31 chemical hits (Additional file 2: Excel[®] sheet 2). The chemical hits were subjected to a further exclusion criterion to eliminate non-pharmaceutical and non-pesticide chemicals and to retain only chemicals with well described mode of action. Finally, a total of 18 chemical hits were analyzed in this review (Additional file 2: Excel[®] sheet 3).

To analyze the association of the expected mode of action of a chemical to its observed effects (i.e., hypo- or hyperactivity) in zebrafish embryos, a comparison was done in relation to individual substances with known neuroactive mode of action or substance classes with different neuroactive mode of action. Furthermore different behavioral test methods were compared for the same compounds.

Comparison of individual substances with known neuroactive mode of action

Neuroactive substances with at least three entries in the established literature collection were compared to estimate whether in zebrafish embryos:

- 1. Similar behavioral methods resulted in a consistent behavioral response across studies with regard to anticipated activity (hypo- or hyperactivity),
- 2. Different methods (STC, PMR, LMR, LMR-L/D) gave consistent anticipated activity (hypo- or hyper-activity),
- 3. The observed activity was consistent with the anticipated activity regardless of the method used,
- 4. The respective effect concentrations in the different studies are similar—in cases when hypo- or hyperactivity is consistent between the studies.

Eighteen different comparative assessments were conducted. These were organized into three groups according to the expected effect, based on the MoAhyperactive, hypoactive and unclear. We discussed all 18 substances but only show herepentylenetetrazole (PTZ) and abamectin as representative substances for hyperactivity and hypoactivity, respectively. Detailed discussions and corresponding figures for the remaining substances can be found in Additional file 1. Nonetheless, results for all substances are summarized in Table 3. A comprehensive overview of all data is shown in Fig. 3. The effect concentrations for all 18 chemicals span over 8 orders of magnitude and individual chemicals range over 2-3 orders of magnitude. Such high variation in effect concentrations reveals the heterogeneity of the results obtained which may be attributed to the use of different experimental protocols and parameters. For instance, an inconsistent activity trend (hyper- or hypoactivity) can be

Table 3 Su	ummary of Coi	mparative an	alysis for ind	lividual substanc	es that are expe	:ted to provoke hyperact	ivity, hypoactivi	ty and uncle	ar activity	
Chemical	Number of entries per chemical	Mode of action (MoA) ^c	Expected activity based on MoA	Q1: Do similar methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q2: Do different methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q3: Regardless of the method used, is the observed activity consistent with the expected activity? ^b	Q4: Are effect concentrations varying within a factor of 10 when hypo- or hyperactivity is consistent?	Risk of Bias factors ^a	Behavioral test method	References
Aconitine	m	Activation of voltage- gated sodium ion channel	Hyperactivity	N	Yes	Yes: LMR(L/D) = 1/2; PMR = 1/1	Yes	Exposure duration	PMR; LMR (L/D)	[2, 31, 60]
Chlorpyrifos	22	Acetylcho- linesterase Inhibitor	Hyperactivity	Yes for STC	° Z	Yes: STC = 2/2; PMR = 0/1; LMR = 1/10; LMR(L/D) = 2/9	<u>8</u>	Exposure duration; Exposure concen- tration; Endpoint parameter	STC; PMR; LMR(L/D); LMR	[14, 16, 24, 41, 53, 54, 56, 69, 71, 80, 89, 93, 106, 112, 120, 125]
Diazinon	12	Acetylcho- linesterase inhibitor	Hyperactivity	No: Some studies show no effect	° Z	Yes: STC = 0/2; PMR = 0/1; LMR = 0/3; LMR(L/D) = 1/6	Q	Exposure concentra- tion; devel- opmental stage; Endpoint parameter; Exposure duration	STC; PMR; LMR; LMR(L/D)	[16, 61, 68, 89, 99, 101, 109, 117, 120, 125]
Endosulfan	4	GABA-gated chloride channel antagonist	Hyperactivity	Yes	° Z	Yes: STC = $0/1$; PMR = $0/1$; LMR(L/D) = $2/2$	°N N	Exposure duration; Endpoint parameter; develop- mental stage	PMR; STC; LMR(L/D)	[25, 68, 87, 89]
lsoprotereno	4	Beta- adrenergic receptor agonists	Hyperactivity	Yes	Q	Yes: $PMR = 3/3$; LMR(L/D) = 0/1	Yes	Develop- mental stage; exposure concentra- tion	PMR; LMR(L/D)	[21, 39, 60]

Table 3 (co	ontinued)									
Chemical	Number of entries per chemical	Mode of action (MoA) ^c	Expected activity based on MoA	Q1: Do similar methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q2: Do different methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q3: Regardless of the method used, is the observed activity consistent with the expected activity? ^b	Q4: Are effect concentrations varying within a factor of 10 when hypo- or hyperactivity is consistent?	Risk of Bias factors ^a	Behavioral test method	References
Nicotine	2	Nicotinic acetyl- choline receptor agonist	Hyperactivity	Yes for LMR	Yes	Yes: STC = 1/2; PMR = 0/1; LMR = 2/2;LMR(L/D) = 1/2	2	Exposure duration; Endpoint parameter; Analysis duration	STC; PMR; LMR; LMR(L/D)	[2, 14, 68, 79, 86, 89, 113]
Pentylene- tetrazole (PTZ)	16	Inhibiting GABAa receptor	Hyperactivity	Yes	Yes	Yes: LMR = 6/7; LMR(L/D) = 9/9	Yes	Light conditions; exposure concentra- tion	LMR; LMR(L/D)	[1, 5, 7, 10, 14, 31, 32, 70, 74, 85, 109, 115, 124]
Abamectin	Ś	Activation of GABA- gated chloride channel; glutamate- gated chloride channel	Hypoactivity	Yes	Yes	Yes: STC = 4/4; PMR = 1/1	Ŷ	Material used for exposure vessel	STC; PMR	[86, 87, 89, 118, 121]
Carbamaz- epine	Q	Sodium channel blocker	Hypoactivity	Yes	Yes	Yes: STC = 1/1; PMR = 0/1; LMR = 2/3; LMR(L/D) = 1/1	Yes	Exposure duration; exposure concentra- tion	STC; PMR; LMR; LMR(L/D)	[9, 10, 14, 77, 89, 121]
Diazepam	2	Stimulates GABA receptor	Hypoactivity	Yes	Yes	Yes: PMR = 2/2; LMR = 1/1; LMR(L/D) = 1/2	OZ	Exposure concen- tration; exposure duration; Endpoint	PMR; LMR; LMR(L/D)	[10, 21, 24, 60, 110]

Table 3 (co	intinued)									
Chemical	Number of entries per chemical	Mode of action (MoA) ^c	Expected activity based on MoA	Q1: Do similar methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q2: Do different methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q3: Regardless of the method used, is the observed activity consistent with the expected activity? ^b	Q4: Are effect concentrations varying within a factor of 10 when hypo- or hyperactivity is consistent?	Risk of Bias factors ^a	Behavioral test method	References
Emamectin benzoate	m	Activation of GABA- gated chloride channel; glutamate- gated chloride channel	Hypoactivity	Yes	Yes	Yes: STC = 2/2; PMR = 1/1	2 Z	Exposure well size; endpoint parameter	STC; PMR	[86, 89, 121]
Leveti- racetam	m	Inhibiting voltage- dependent calcium channel	Hypoactivity	° Z	Yes	Yes: LMR = 1/2; LMR(L/D) = 1/1	Yes	Exposure duration; develop- mental stage; exposure concentra- tion, light conditions	LMR; LMR(L/D)	[9, 10, 77]
Valproate	2	Inhibition of GABA transami- nase or voltage- gated sodium channel	Hypoactivity	° N	Yes	Yes: PMR = 1/1; LMR = 1/4; LMR(L/D) = 5/7	°Z	Exposure concen- tration; exposure duration	PMR; LMR(L/D); LMR	[4, 9, 10, 14, 22, 24, 70, 77, 89, 115, 127, 128]
Acetami- nophen	0	Cyclooxyge- nase Inhibi- tors	Not clear	oN	°N N	NA	ИА	Exposure duration; exposure concentra- tion; devel- opmental- stage	STC; PMR; LMR; LMR(L/D)	[24, 89, 90, 105, 122]

Table 3 (cc	ontinued)									
Chemical	Number of entries per chemical	Mode of action (MoA) ^c	Expected activity based on MoA	Q1: Do similar methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q2: Do different methods give consistent hypo- or hyperactivity?	Q3: Regardless of the method used, is the observed activity consistent with the expected activity? ^b	Q4: Are effect concentrations varying within a factor of 10 when hypo- or hyperactivity is consistent?	Risk of Bias factors ^a	Behavioral test method	References
Apomor- phine	4	Stimulation of post- synaptic dopamine D2-type receptors	Not clear	Yes	Yes	NA	92	Light conditions; develop- mental stage	PMR, LMR, LMR(L/D)	[21, 30, 51, 60]
Haloperidol	4	Doparnine receptor antagonist	Not clear	Yes	oz	Ą	Yes	Endpoint parameter; exposure concen- tration; Develop- mental stage; zebrafish strain	LMR; LMR(L/D); PMR	[40, 51, 81, 89]
Methimazole	4	Binds to thyroid peroxidase to inhibit conversion of iodide to iodine	Not clear	Ч Z	Yes	NA	°Z	Exposure duration	STC; PMR; LMR; LMR(L/D)	[34, 89, 105]
Retinoic acid	4	Retinoic acid receptor agonist	Not clear	Yes	Yes	NA	Yes	Endpoint parameter	STC; PMR; LMR(L/D)	[4, 89, 119]
^a Experimenta as risk of bias fr ^b The numerat	l parameters relate or each comparisou or is the number o	ed to exposure des n are appropriatel of consistent result	sign and effect r y described in tl s while the den	measurement were cons he Additional file 1. The iominator is total numbe	sidered to identify risk o number of times each er of results. Results obt	if bias factors that may lead to de experimental parameter occurre ained in Question 3 were used to	eviating outcomes. The d as a risk of bias was us estimate the percenta	rational for select sed to estimate th ige concordance f	ting an experime ne most influenti for organophosp	ntal parameter al parameters hates,

avermectins and anticonvulsants

^c Mode of action was obtained from different sources including http://www.drugbank.ca and published literature



seen for chemicals expected to cause hyperactivity and this is probably influenced by high variability of exposure duration (Fig. 3).

Abamectin

Abamectin is an avermectin insecticide expected to cause hypoactivity by activating GABA-gated chloride channel [17]. Five studies were compared. All studies reported hypoactivity (Fig. 4). Effect concentration for hypoactivity reported in all studies is within a factor of 10 (0.36–3.13 μ M) except the STC study by Raftery and Volz [87] which reported an effect at 0.25 μ M. This lower effect concentration could be due to conducting exposure in glass beakers instead of plastic well plates as exposure vessel. Abamectin is highly hydrophobic (log $D_{pH7.4(ACD/Labs)}$ of 5.85) and hence has higher affinity to bind to plastic than glass. Therefore, abamectin may be highly

bioavailable to the embryos in a glass container leading to effects occurring at lower concentration.

Pentylenetetrazole (PTZ)

Pentylenetetrazole is a convulsant drug and it is expected to cause hyperactivity by binding to GABA receptors [108]. Sixteen studies were compared. PTZ showed hyperactivity effects in all the studies except the LMR study by Bugel and Tanguay [14] which reported no effect (Fig. 4). However, in this study, exposure concentrations 2.5-fold below the effect concentration of the other studies were used and this was probably below the effective range of PTZ. Even though the effect concentrations for hyperactivity were within a factor of 10 in all studies, hypoactivity was also reported, at different concentrations and light periods, as an additional effect to hyperactivity in some LMR-L/D studies. The effect of PTZ may be enhanced under alternating light–dark



represents the exposure duration (hpf). References for each study can also be found in Additional file 2: Excel sheet 3

periods and PTZ has been reported to cause a reversal of the observed activity in control treatment, i.e., higher activity in dark and lower activity in light phase for nonexposed embryos [31, 115]. Consequently, it is likely that PTZ induces a differential response in light and dark phases and this effect is only observed under alternating light conditions. Hence, the use of different light conditions during measurement could be a limiting factor for comparing the output from different behavior methods. Nevertheless, alternating light conditions could give important insights on how a substance modulates behavior.

Comparison of substance classes with same/similar mode of action

Neuroactive chemicals which emerge from the same chemical class can be anticipated to exhibit similar mode of action. The aim of this comparison is to evaluate the consistency of the observed activity of chemicals in zebrafish to the expected activity within a certain class of chemicals (organophosphates, avermectins and anticonvulsant drugs) e.g., do all chemicals within a class conform to the expected mode of action (hypo- or hyperactivity) in zebrafish embryos?

Organophosphates

Organophosphates act by inhibiting the acetylcholinesterase enzyme (AChE) which breaks down acetylcholine, and therefore keeps the acetylcholine-gated sodium channels open for more ions to flow into the cell leading to an action potential [17]. Hence, it is expected for organophosphates to cause hyperactivity in zebrafish at lower concentrations but hypoactivity at higher concentrations due to over-excitation resulting in paralysis induced by abnormal mechanical stress [111] or axonal deformation [123]. Additionally, the interaction of exposure concentration and duration plays a major role. For instance, chlorpyrifos caused hyperactivity at a low concentration of 0.03 μ M and long duration of 120 h in an LMR-L/D study (Fig. 5). Inversely, a high concentration of 11 μ M and short duration of 4 h also resulted in hyperactivity [53, 80]. A summary of the data for organophosphates (Chlorpyrifos and Diazinon) is shown in Fig. 5 and in Additional file 1. Although hyperactivity is expected for lower test concentrations, it was only observed in 18% of the studies. The percentage concordance of observed to expected activity was estimated to be 50 (n=4), 0 (n=2), 7.7 (n=13) and 20 (n=15) % for STC, PMR, LMR and LMR-L/D, respectively (number of studies per method in parenthesis). Considering that STC has the highest percentage of consistency, we could deduce that STC may be the most-sensitive method to detect the hyperactive effect of organophosphates. This could be due to the assumed capability of the STC to measure basic response of the primary motor neurons [92, 98] rather than the secondary neurons measured in LMR. Many organophosphates require biotransformation for highest inhibition capacity [18], and a limited biotransformation in embryos would represent a confounding factor and might interfere with the detection of


behavioral effects in early embryo stages. Interestingly, the LMR-L/D study by Leuthold et al. [68] was the only one that showed hyperactivity for diazinon (Fig. 5). This could be due to the use of a combination of older developmental stage of 96 hpf (with potential higher biotransformation) and a short exposure duration of 24 h (with potential no over-excitation or paralysis effect). However, not only the oxon-metabolite but also the parent compound of chlorpyrifos induced hyperactivity in the STC at an earlier developmental stage of 24 hpf (with potential limited biotransformation). This suggests the influential AChE inhibiting activity of chlorpyrifos or a high efficacy of the low amount of the oxon-metabolite resulting from the limited biotransformation [120, 121]. Reif et al. [89] also found a relatively lower effect concentration (0.64 µM) for chlorpyrifos-oxon compared to chlorpyrifos (64 µM) and this supports the limited biotransformation of chlorpyrifos in younger developmental stages. Hence, for neuroactive compounds such as organophosphates which require bioactivation, the stage-dependent bioactivation or the internal concentrations related to the exposure time may influence the effect concentrations.

Avermectins

Avermectins act by activating the GABA-gated chloride channel and/or glutamate-gated chloride channel leading to an inhibitory potential and hence hypoactivity [17]. Both avermectin chemicals considered in this study, emamectin and abamectin, showed hypoactivity which is consistent with their mode of action. A summary of the data for avermectins shows that 100% hypoactivity effect was reported. Percentage concordance of observed to expected activity was estimated to be 100 (n=6) and 100 (n=2) % for STC and PMR, respectively (number of studies in parenthesis). This shows that avermectins can be reasonably detected in short-duration embryo tests. See Additional file 1 for more details on abamectin and emamectin.

Anticonvulsant drugs

Anticonvulsants are a class of drugs used for controlling seizure activity. They propagate their action on the nervous system via different mechanisms including: (1) Blockage of the sodium-gated channels. (2) Indirect or direct enhancement of inhibitory GABA neurotransmission. (3) Inhibition of excitatory glutamatergic neurotransmission [107]. Based on their mode of action, it is expected that anticonvulsants will cause hypoactivity in zebrafish embryo. A summary of the data for anticonvulsants (Fig. 6) shows that despite using different methods, 62% hypoactivity effect was reported. Percentage concordance of observed to expected activity was estimated to be 100 (n = 1), 75 (n = 4), 50 (n = 10)and 64 (n=11) % for STC, PMR, LMR and LMR-L/D, respectively (number of studies in parenthesis). STC was not considered since only one study was found. Hence, we can deduce that PMR and LMR-L/D may be the most-sensitive method to detect anticonvulsants and this could be due to the light stimulation utilized in both methods which may interact with complex nervous processes in the brain.





Comparison of different behavioral methods

In the last part of this results section, we tried to estimate whether different behavioral measurement methods or contrasting experimental parameters give similar results. For that we identified case studies that reported different methods or setups for the same chemical or different chemicals. Here, the goal is to compare two behavioral methods using substance(s) tested in both methods.

Effects of abamectin in the STC

Case study: Raftery et al. [86, 87], Vliet et al. [118], Weichert et al. [121]

For abamectin, an enhancer of GABA- or glutamategated chloride channel, five different studies have reported the effects in the STC (Fig. 4). While the material used for exposure vessels varied to some extent, developmental stage, exposure duration and duration of behavior analysis were very similar for these studies. The effect concentrations of the different studies were within a factor of 10 (except[87]) and in all studies hypoactivity was observed. As described earlier (see comparison of individual substances), the minor differences in effect concentrations may be attributed to the use of different exposure vessels. For instance, the lowest effect concentration (0.25 μ M) was reported in a study that used glass exposure vessels [87]. Moreover, exposures in 24-well plates, with lower surface area, resulted in lower effect concentrations compared to 384-well plates [86, 118]. Abamectin has a high log Kow of 5.85 and this suggests that the lower effect concentrations in glass and 24-well vessels could be due to higher bioavailability. This may be attributed to higher adsorption to plastic wells (relative to glass) and especially 384-well plates (relative to 24-well plates). In general, the results of STC were in line with the mode of action and largely consistent between studies and differences attributed to the adsorption of the compound to exposure vessels. However, Vliet et al. [118] concluded that STC might not be capable of distinguishing between modes of action because they observed only hypoactivity even for chemicals with hyperactive MoA. Possible reasons for their observed hypoactivity include the use of a single exposure concentration and use of a different endpoint (percentage of embryos showing STC), which might be inherently biased (see "Endpoint parameter" section for more details).

Comparison of STC and PMR

Case study: Fipronil, emamectin benzoate, carbamazepine, abamectin

Comparison of results between STC and PMR for some chemicals showed a lack of consistency in the observed effect concentrations. There are two exceptions. First, abamectin comparison in which the STC studies [87, 121] showed similar effect concentrations to another PMR study [89]. Second, behavioral effects were observed for carbamazepine in the STC test [121] at a concentration not tested in the PMR [89]. The chemicals that show inconsistencies include; fipronil, chlorpyrifos and emamectin. For fipronil, an effect concentration of 25 µM was reported for the STC study by Raftery and Volz [87], while the PMR study by Reif et al. [89] showed no effect at concentrations up to 64 µM. This difference could be due to the use of plastic well plates in the study of Reif et al. [89] leading to a possible adsorption and hence decreased exposure and effect concentrations. For emamectin, the STC study by Weichert et al. [121] reported a hypoactivity effect at 1.03 μ M, while the PMR study by Reif et al. [89] reported 0.0064 µM. Even though STC and PMR have many similar experimental parameters, there is a major difference in their endpoint parameter. While PMR measures movement of the whole embryo under light stimulation, STC only measures the spontaneous tail contractions. This difference could lead to major differences in the behavioral outcome of both tests (see Additional file 1 for more details).

STC/LMR comparison

Case study: Chlorpyrifos in Selderslaghs et al. [105, 106]

Selderslaghs et al. [105, 106] exposed zebrafish embryos to different chemicals and both the LMR and STC were conducted to identify neuroactive effects or effects on neurodevelopment. STC captured effects of more substances and this sensitivity difference could be due to a different range of exposure concentrations. Higher exposure concentrations were used for the STC test because exposure concentrations were based on the highest non teratogenic concentration estimated at exposure durations of 24 and 144 h, respectively [105]. Even though, different concentration ranges were used, effects were observed at an overlapping concentration of 1.8 µM and 2.1 µM for chlorpyrifos in STC and LMR, respectively [106]. However, the effects were not consistent—hyperactivity in STC and hypoactivity in LMR. This activity difference may be due to the influence of exposure duration (steady state not reached in shorter exposure), and/ or developmental stage-dependent metabolic activation. As discussed earlier (see sections on exposure duration and organophosphates), longer exposure might increase the internal concentration of the substance and thus increase effects. Vice versa, a short exposure might need higher external and thus internal concentrations to get the same effects. In the case of chlorpyrifos, one could assume that the longer exposure caused over-excitation of acetylcholine receptors due to the irreversible inhibition of AChE and thus the resulting paralysis translates

to hypoactivity. Therefore, similar exposure durations should be used for a comparison of the sensitivity of both assays (albeit differences in toxicokinetics and targeted receptors of the tested developmental stages may still apply). Moreover, STC measures the response of the primary motor neurons in the embryo while LMR measures the response of both primary and secondary motor neurons in free swimming embryo [42, 126]. Hence, differences in the results could occur because these assays partially target different neuronal structures.

PMR/PMR comparison

Case study: Isoproterenol, apomorphine and diazepam in Kokel et al. [60] and Copmans et al. [21]

Kokel et al. [60] and Copmans et al. [21] were selected for this comparison because crucial experimental parameters including exposure age, exposure duration and analysis time were similar. Also, three chemicals namely isoproterenol, apomorphine and diazepam were tested in both studies (see Additional file 1). Despite the fact that a single concentration was tested in both studies, similar effect concentrations and activity were obtained. Embryos were hyperactive to isoproterenol and apomorphine, while hypoactivity was observed for diazepam (Table 3). These similar effects observed for different studies indicate the reproducibility of PMR tests if experimental parameters are similar. The fact that the observed activity of embryos for the three chemicals was consistent with the expected activity assumed from the MOA suggests that PMR can be a valuable test to detect mode of action of neuroactive substances if steady state of concentrations can be achieved within exposure window and the respective receptor is available.

Comparison of LMR with different light regimes *Case study: Pentylenetetrazole (PTZ)*

There are two major types of LMR reported in the literature: The non-stimulus LMR either conducted in constant dark or light phase only and the LMR using alternating light-dark cycles (LMR-L/D). A comparative assessment of the different types of LMR was difficult due to the use of different endpoint parameters such as total distance moved, time spent on locomotion, swimming speed, mean turn angle, etc. PTZ was the only chemical for which sufficient data could be identified to enable a comparative assessment (Fig. 4). In the LMR-L/D, PTZ induces a behavior which is opposite to that observed in control embryos, i.e., high activity in dark period and low activity in light period for embryos in untreated solution [31, 115]. Therefore, all hyperactivity effects were recorded during the light phase in the LMR-L/D tests with PTZ. In the LMR, hyperactivity was recorded irrespective of the analysis being conducted in continuous light or dark phase. Interestingly, effect concentrations for hyperactivity reported for both setups in all the studies were within a variation factor of 10. This shows that the hypoactivity observed only in the LMR-L/D tests was mainly driven by alternating light/dark cycles. This suggests that PTZ might react differentially under alternating light conditions and the LMR-L/D could be utilized as an extensive diagnostic tool for such epileptic effects in zebrafish.

Conclusions

Based on the assessment of published zebrafish embryo behavior studies it was possible to identify major factors impacting the magnitude and type of response in behavioral assays. Exposure duration, exposure concentration, endpoint parameter and developmental stage were the most influential parameters. Understanding and controlling these factors and potentially revising/harmonizing protocols would help reduce variability of results for hazard assessment of chemicals.

The review was motivated by the hypothesis that the MoA of chemicals may be reflected by the type of response in behavioral assays, i.e., whether hypo- or hyperactivity is induced by the exposure. The data indicated that a clear association of the response with the mode of action was difficult (e.g., 18 and 62% consistency for organophosphates and anticonvulsants, respectively), partially also caused by experimental limitations and diversity of protocols used. Despite the low number of STC studies, the STC test appears to reveal the most consistent results with respect to the expected hyperactivity of a substance (especially for organophosphates). However, limited biotransformation capacity and uptake of chemicals into the embryos may affect the detectability and sensitivity of hyperactivity in the STC as was shown by the effects of the organophospate compounds, chlorpyrifos and diazinon. The PMR also shows great potential to predict neuroactive MoA; however, the use of single exposure concentrations in many PMR studies limited the appropriate evaluation of its possible potential. LMR (L/D) showed 64% of the expected hypoactivity related to the MoA of anticonvulsants. However, the anticipated hyperactivity for organophosphates could not be shown in most cases and which could be partially attributed to long exposure duration (e.g., 3-5 days). Long exposure durations may impact the neuronal development due to axonal defects or seizure-induced paralysis [111, 123]. Hence, compromising the function/structure of the nervous system and indirectly resulting in hypoactivity. The different LMR test methods may only acquire the ability to predict hyperactivity if the exposure duration is significantly reduced as shown in the PTZ studies and as reported in Leuthold et al. [68]. The possibility

to discriminate neuro-developmental effects from direct functional effects may also improve MoA prediction. Finally, it is evident that behavioral tests are capable of screening neuroactive substances and a combination of the four tests considered in this review will be more powerful and reliable than the individual tests alone. Nonetheless, the full potential of these methods for risk assessment of chemicals cannot be realized until the impacts of experimental parameters are addressed more systematically in comparative studies.

Recommendations

The experimental design is always strongly related to the research question. Hence, the type of assays and conditions used for behavioral tests may be different depending on the goal of the study. The perspective in this manuscript was to analyze the comparability and reproducibility of behavioral test results for identifying neuroactivity MoA within a prospective and diagnostic risk assessment framework. The recommendations given below are based on this particular goal but may be different for other research questions. With respect to this focus and the results of this review, we suggest to particularly address the most important experimental parameters in behavioral assays:

- 1. Exposure duration could have a strong impact on behavioral outcomes for several reasons such as biotransformation rates or overall kinetics. From the data used in this review, it appears that functional neurotoxicity can be provoked already by relative short exposure periods, while developmental neurotoxicity is rather detected by long-term exposure exceeding 24 h and including early developmental stages. Hence, MoA-specific neuroactivity may rather be detected when using short-term exposure scenarios (<24–32 h of exposure) provided that uptake and biotransformation are not limiting the availability of the compound at the target site.
- 2. Behavioral tests are sensitive to exposure concentrations and responses may change within a range of low to high concentrations (e.g., due to seizure paralysis caused by high overstimulation or interfering of developmental toxicity at high exposure concentrations). Therefore, test design should include a range of concentrations that allow capturing of the potential transition from low dose hyperactivity to high dose hypoactivity effects. Concentration–response relationships should also be related to lethal effect concentrations at defined exposure periods and to predicted concentrations causing baseline toxicity. This will indicate whether behavioral effects may

have been caused by unspecific secondary responses to overt toxicity.

- 3. Zebrafish embryos develop rapidly and their normal patterns of embryonic movements change with developmental stage. Hence, harmonization of protocols with regard to the developmental stages used for assessment is likely to increase reproducibility and reliability of results. Factors such as biotransformation requirement of the substance and availability of target receptor should be considered during experimental design.
- 4. For uniformity reasons, it seems from the analyzed literature that it is generally desirable to select distance moved for LMR and LMR-L/D and frequency of STC as optimal endpoint parameters. Other parameters could be used additionally until proof of usability.
- 5. Based on the review, we suggest to consider the following parameters to be used for the different behavioral assays.

STC:

- Exposure duration: 2–26 hpf (±2). Shorter durations maybe used for MoA analysis, for indirect assessment of toxicokinetics or to distinguish between acute and developmental effects;
- Selection of exposure concentration should relate to lethal or sublethal concentrations such as the LC_{50} at 24 hpf as the highest test concentrations and a full concentration–response analysis should be performed;
- Endpoint parameter: Frequency or number of STC;
- Developmental stage: Measurement should be conducted between 23 and 25 hpf (based on the age at which maximum STC is observed) to account for the stage dependency of the frequency.

PMR:

- Exposure duration: 2–32 hpf (±2). Shorter durations within this period may be used for MoA analysis or indirect assessment of toxicokinetics or to distinguish between acute and developmental effects;
- Selection of exposure concentration should relate to lethal or sublethal concentrations such as the LC₅₀ at 24 or 48 hpf as the highest test concentrations and a full concentration–response analysis should be performed;
- Endpoint parameter: Movement activity as used in Kokel et al. [60] and Copmans et al. [21];
- Analysis duration: 30-s measurement from 30 hpf.

LMR or LMR-L/D:

- Exposure duration: 2–120 hpf for developmental neurotoxicity assessment. Short durations, e.g., from 96 to 120 hpf may be appropriate for identifying acute neuroactivity effects not related to neurodevelopmental toxicity;
- Selection of exposure concentration should relate to lethal or sublethal concentrations such as the LC_{50} at 72 or 96 hpf as the highest test concentrations and a full concentration–response analysis should be performed;
- Endpoint parameter: Total distance moved and other endpoints such as swimming duration and velocity could be used as additional.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi. org/10.1186/s12302-019-0270-5.

Additional file 1. Detailed comparison of individual substances for all 18 substances represented in Figure 3 of main text. **Table S1.** Sources of fish embryo lethality data used in Figure 3 of main text. **Figure S1.** Summary of the literature selection process in KNIME.

Additional file 2. Excel sheet 1—111 Literature search hits and the corresponding chemicals. Excel sheet 2—31 chemical hits after regrouping and elimination of chemicals with less than 3 entries. Excel sheet 3—Final 18 chemical hits and the experimental parameters analyzed in the main text of this study. Excel sheet 4—Summary of comparative analysis performed in this study as shown in Table 3 of the main text.

Abbreviations

MoA: mode of action; mins: minutes; AChE: acetylcholinesterase; nAChr: nicotine receptors; GABA: gamma-aminobutyric acid receptors; STC: spontaneous tail coiling; PMR: photomotor response; LMR: locomotor response; LMR-L/D: alternating light- and dark-induced locomotor response; DMSO: dimethyl sulfoxide; PTZ: pentylenetetrazole.

Acknowledgements

The critical comments and discussions of Wibke Busch, Rolf Altenburger and Nils Klüver to the manuscript are gratefully acknowledged. Parts of this study were presented at the SETAC EU conference in Rome 2018.

Authors' contributions

AO, SS and EK conceptualized the study. All authors provided comments for the design of the study. AO performed the literature search, analyzed the results and drafted the manuscript. All authors edited and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was financially supported by the German bmbf project "Neurobox" (German Ministry of Education and Science, FKZ 02WRS1419F). We are also acknowledging financial support through the Helmholtz Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren_HGF program topic "Chemicals in the Environment"_CITE.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its additional files].

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

i tot upplicubic

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Dept. Bioanalytical Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany. ² Institute for Environmental Sciences, University of Koblenz-Landau, 76829, Fortstraße 7, Landau, Germany.

Received: 19 August 2019 Accepted: 19 October 2019 Published online: 09 November 2019

References

- Afrikanova T, Serruys A-SK, Buenafe OEM et al (2013) Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. PLoS ONE 8:e54166. https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0054166
- Ali S, Champagne DL, Richardson MK (2012) Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. Behav Brain Res 228:272–283. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.020
- Bae M-J, Park Y-S (2014) Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. Sci Total Environ 466–467:635–649. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.075
- Bailey JM, Oliveri AN, Karbhari N et al (2016) Persistent behavioral effects following early life exposure to retinoic acid or valproic acid in zebrafish. Neurotoxicology 52:23–33. https://doi.org/10.1016/j.neuro .2015.10.001
- Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier AH (2005) Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. Neuroscience 131(3):759–768. https://doi.org/10.1016/j.neuro science.2004.11.031
- Basnet R, Zizioli D, Taweedet S et al (2019) Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. Biomedicines 7:23. https://doi. org/10.3390/biomedicines7010023
- Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL et al (2012) Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. Dis Model Mech 5:773–784. https://doi. org/10.1242/dmm.010090
- Beekhuijzen M, de Koning C, Flores-Guillén ME et al (2015) From cutting edge to guideline: a first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod Toxicol 56:64–76. https ://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050
- Beker van Woudenberg A, Snel C, Rijkmans E et al (2014) Zebrafish embryotoxicity test for developmental (neuro)toxicity: demo case of an integrated screening approach system using anti-epileptic drugs. Reprod Toxicol 49:101–116. https://doi.org/10.1016/j.repro tox.2014.07.082
- Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P (2007) Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. Epilepsy Res 75:18–28. https://doi.org/10.1016/j.eplep syres.2007.03.015
- Brack W, Aissa SA, Backhaus T et al (2019) Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environ Sci Eur 31:10. https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2
- Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H et al (2005) Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX-Altern Anim Exp 22(2):87–102
- 13. Brox S, Ritter AP, Küster E, Reemtsma T (2014) A quantitative HPLC-MS/ MS method for studying internal concentrations and toxicokinetics of

34 polar analytes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Anal Bioanal Chem 406:4831–4840. https://doi.org/10.1007/s00216-014-7929-y

- Bugel SM, Tanguay RL (2018) Multidimensional chemobehavior analysis of flavonoids and neuroactive compounds in zebrafish. Toxicol Appl Pharmacol 344:23–34. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.019
- Busch W, Schmidt S, Kühne R et al (2016) Micropollutants in European rivers: a mode of action survey to support the development of effectbased tools for water monitoring. Environ Toxicol Chem 35:1887–1899. https://doi.org/10.1002/etc.3460
- Cao F, Souders CL, Li P et al (2018) Biological impacts of organophosphates chlorpyrifos and diazinon on development, mitochondrial bioenergetics, and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicol Teratol 70:18–27. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.10.001
- 17. Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. Annu Rev Entomol 58:99–117. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645
- Chambers J, Oppenheimer SF (2004) Organophosphates, serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity. Toxicol Sci 77:185–187
- Chen TH, Wang YH, Wu YH (2011) Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. Aquat Toxicol 102:162–166. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.010
- Colwill RM, Creton R (2011) Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio) larvae. Behav Process 86:222–229. https://doi.org/10.1016/J. BEPROC.2010.12.003
- 21. Copmans D, Meinl T, Dietz C et al (2016) A KNIME-based analysis of the zebrafish photomotor response clusters the phenotypes of 14 classes of neuroactive molecules. J Biomol Screen 21:427–436. https://doi.org/10.1177/1087057115618348
- Cowden J, Padnos B, Hunter D et al (2012) Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. Reprod Toxicol 33:165–173. https ://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2011.11.111
- Crofton K, Mundy W (2011) Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. Altex 28:9–15
- 24. Dach K, Yaghoobi B, Schmuck MR et al (2019) Teratological and behavioral screening of the national toxicology program 91-compound library in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol Sci 167:77–91. https://doi. org/10.1093/toxsci/kfy266
- Dale K, Ellingsen S, Dale K et al (2017) Vitamin E reduces endosulfaninduced toxic effects on morphology and behavior in early development of zebrafish (*Danio rerio*). Food Chem Toxicol 101:84–93. https:// doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.004
- 26. Damstra T (1978) Environmental chemicals and nervous system dysfunction. Yale J Biol Med 51:457–468
- 27. De Esch C, Van Der Linde H, Slieker R et al (2012) Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. Neuro-toxicol Teratol 34:425–433. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.03.002
- Diekmann M, Nagel R (2005) Different survival rates in zebrafish (Danio rerio) from different origins. J Appl Ichthyol 21:451–454. https://doi.org/ 10.1111/j.1439-0426.2005.00622.x
- Doke SK, Dhawale SC (2015) Alternatives to animal testing: a review. Saudi Pharm J 23:223–229. https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2013.11.002
- Ek F, Malo M, Andersson MÅ et al (2016) Behavioral analysis of dopaminergic activation in zebrafish and rats reveals similar phenotypes. ACS Chem Neurosci 7:54. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00014
- Ellis LD, Seibert J, Soanes KH (2012) Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. Brain Res 1449:46–59. https://doi. org/10.1016/j.brainres.2012.02.022
- 32. Ellis LD, Soanes KH (2012) A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics. Behav Brain Res 233:450–457. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2012.05.043
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA et al (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. Aquat Toxicol 97:79–87. https://doi. org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008
- 34. Fetter E, Baldauf L, Da Fonte DF et al (2015) Comparative analysis of goitrogenic effects of phenylthiourea and methimazole in zebrafish

embryos. Reprod Toxicol 57:10–20. https://doi.org/10.1016/j.repro tox.2015.04.012

- 35. Fischer FC, Cirpka OA, Goss K-U et al (2018) Application of experimental polystyrene partition constants and diffusion coefficients to predict the sorption of neutral organic chemicals to multiwell plates in in vivo and in vitro bioassays. Environ Sci Technol 52:13511–13522. https://doi. org/10.1021/acs.est.8b04246
- Fischer FC, Henneberger L, König M et al (2017) Modeling exposure in the Tox21 in vitro bioassays. Chem Res Toxicol 30:1197–1208. https:// doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00023
- Fitzgerald JA, Kirla KT, Zinner CP, vom Berg CM (2019) Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. Sci Rep 9:13647. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49614-y
- Fraser TWK, Khezri A, Jusdado JGH et al (2017) Toxicant induced behavioural aberrations in larval zebrafish are dependent on minor methodological alterations. Toxicol Lett 276:62–68. https://doi.org/10.1016/j.toxle t.2017.05.021
- 39. Gauthier PT, Vijayan MM (2018) Nonlinear mixed-modelling discriminates the effect of chemicals and their mixtures on zebrafish behavior. Sci Rep 8(1):1999. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20112-x
- Giacomini NJ, Rose B, Kobayashi K, Guo S (2006) Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. Neurotoxicol Teratol 28:245–250. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.01.013
- Glazer L, Wells CN, Drastal M et al (2017) Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. Neurotoxicology 66:221–232. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.007
- 42. Grunwald DJ, Kimmel CB, Westerfield M et al (1988) A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. Dev Biol 126:115–128
- Gülden M, Mörchel S, Seibert H (2001) Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: cell concentration. Toxicol In Vitro 15:233–243. https://doi.org/10.1016/S0887 -2333(01)00008-X
- Gülden M, Seibert H (2005) Impact of bioavailability on the correlation between in vitro cytotoxic and in vivo acute fish toxic concentrations of chemicals. Aquat Toxicol 72:327–337. https://doi.org/10.1016/J.AQUAT OX.2005.02.002
- 45. Guryev V, Koudijs MJ, Berezikov E et al (2006) Genetic variation in the zebrafish. Genome Res 16:491. https://doi.org/10.1101/gr.4791006
- Hamm JT, Ceger P, Allen D et al (2019) Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols. Altex 36:103–120. https ://doi.org/10.14573/altex.1804162
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci 86:6–19. https ://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110
- Horstick EJ, Bayleyen Y, Sinclair JL, Burgess HA (2017) Search strategy is regulated by somatostatin signaling and deep brain photoreceptors in zebrafish. BMC Biol 15:4. https://doi.org/10.1186/s12915-016-0346-2
- Huang Y, Cartlidge R, Walpitagama M et al (2018) Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. Sci Total Environ 615:107–114. https://doi.org/10.1016/j.scito tenv.2017.09.260
- Ingebretson JJ, Masino MA (2013) Quantification of locomotor activity in larval zebrafish: considerations for the design of high-throughput behavioral studies. Front Neural Circuits 7:1–9. https://doi.org/10.3389/ fncir.2013.00109
- Irons TD, Kelly P, Hunter DL et al (2013) Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. Pharmacol Biochem Behav 103:792–813. https://doi.org/10.1016/j. pbb.2012.12.010
- 52. Irons TD, Macphail RC, Hunter DL, Padilla S (2010) Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. Neurotoxicol Teratol 32:84–90. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066
- Jarema KA, Hunter DL, Shaffer RM et al (2015) Acute and developmental behavioral effects of flame retardants and related chemicals in zebrafish. Neurotoxicol Teratol 52:194–209. https://doi.org/10.1016/j. ntt.2015.08.010
- 54. Jin Y, Liu Z, Peng T, Fu Z (2015) The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: asurvey on the endpoints at development,

locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. Fish Shellfish Immunol 43:405–414. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.010

- 55. Kais B, Schneider KE, Keiter S et al (2013) DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). Aquat Toxicol 140–141:229–238. https://doi. org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022
- Kienle C, Köhler H-R, Gerhardt A (2009) Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Ecotoxicol Environ Saf 72:1740–1747. https://doi. org/10.1016/J.ECOENV.2009.04.014
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR et al (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 203:253–310. https://doi. org/10.1002/aja.1002030302
- Kimmel CB, Patterson J, Kimmel RO (1974) The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. Dev Psychobiol 7:47–60. https://doi.org/10.1002/dev.420070109
- Klüver N, König M, Ortmann J et al (2015) The fish embryo toxicity test (FET)—identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. Environ Sci Technol. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b019 10
- Kokel D, Bryan J, Laggner C et al (2010) Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. Nat Chem Biol 6:231–237. https://doi.org/10.1038/nchembio.307
- Kristofco LA, Colon Cruz L, Haddad SP et al (2016) Age matters: developmental stage of *Danio rerio* larvae influences photomotor response thresholds to diazinion or diphenhydramine. Aquat Toxicol 170:344– 354. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.011
- Küster E, Altenburger R (2007) Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (*Danio rerio*), Chemosphere 68:751–760. https://doi.org/10.1016/j. chemosphere.2006.12.093
- 63. Lange M, Neuzeret F, Fabreges B et al (2013) Inter-individual and interstrain variations in zebrafish locomotor ontogeny. PLoS ONE 8:e70172. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070172
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. Aquaculture 269:1–20. https://doi.org/10.1016/j.aquacultur e.2007.04.077
- Lazic SE, Grote HE, Blakemore C et al (2006) Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. Eur J Neurosci 23:1829–1838. https://doi.org/10.11 11/j.1460-9568.2006.04715.x
- Legradi J, el Abdellaoui N, van Pomeren M, Legler J (2015) Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. Environ Sci Pollut Res Int 22:16277–16289. https://doi.org/10.1007/ s11356-014-3805-8
- Legradi JB, Di Paolo C, Kraak MHS et al (2018) An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. Environ Sci Eur 30:46. https://doi. org/10.1186/s12302-018-0173-x
- Leuthold D, Klü N, Altenburger R, Busch W (2019) Can environmentally relevant neuroactive chemicals specifically be detected with the locomotor response test in zebrafish embryos? Environ Sci Technol 53(1):482–493. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04327
- Levin ED, Swain HA, Donerly S, Linney E (2004) Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. Neurotoxicol Teratol 26(6):719–723. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.013
- Li F, Lin J, Liu X et al (2018) Characterization of the locomotor activities of zebrafish larvae under the influence of various neuroactive drugs. Ann Transl Med. https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.25
- Li R, Zhang L, Shi Q et al (2018) A protective role of autophagy in TDCIPP-induced developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. Aquat Toxicol 199:46–54. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.016
- 72. Lillicrap A, Belanger S, Burden N et al (2016) Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: a review of developments over the last 2 decades and current status. Environ Toxicol Chem 35:2637–2646. https://doi.org/10.1002/etc.3603
- Liu Y, Carmer R, Zhang G et al (2015) Statistical analysis of zebrafish locomotor response. PLoS ONE 10:e0139521. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0139521

- 74. Long SM, Liang FY, Wu Q et al (2014) Identification of marine neuroactive molecules in behaviour-based screens in the larval zebrafish. Mar Drugs 12:3307–3322. https://doi.org/10.3390/md12063307
- Loucks E, Carvan MJ (2004) Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. Neurotoxicol Teratol 26:745–755. https:// doi.org/10.1016/J.NTT.2004.06.017
- MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL et al (2008) Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. Neurotoxicology 30:52–58. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011
- Martinez CS, Feas DA, Siri M et al (2018) In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. Neurotoxicol Teratol 66:17–24. https://doi.org/10.1016/j. ntt.2018.01.008
- Massei R, Vogs C, Renner P et al (2015) Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*): the role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. Aquat Toxicol 166:36–41. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.011
- Mora-Zamorano FX, Svoboda KR, Carvan MJ (2016) The nicotineevoked locomotor response: a behavioral paradigm for toxicity screening in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and eleutheroembryos exposed to methylmercury. PLoS ONE 11:e0154570. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0154570
- Oliveri AN, Bailey JM, Levin ED (2015) Developmental exposure to organophosphate flame retardants causes behavioral effects in larval and adult zebrafish HHS Public Access. Neurotoxicol Teratol 52:220–227. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.08.008
- Oliveri AN, Levin ED (2019) Dopamine D 1 and D 2 receptor antagonism during development alters later behavior in zebrafish. Behav Brain Res 356:250–256. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.028
- Padilla S, Hunter DL, Padnos B et al (2011) Assessing locomotor activity in larval zebrafish: influence of extrinsic and intrinsic variables. Neurotoxicol Teratol 33:624–630. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005
- Parker MO, Millington ME, Combe FJ, Brennan CH (2012) Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. PLoS ONE 7:e34992. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034992
- Pelka KE, Henn K, Keck A et al (2017) Size does matter—determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Aquat Toxicol 185:1–10. https:// doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.015
- Peng X, Lin J, Zhu Y et al (2016) Anxiety-related behavioral responses of pentylenetetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions. Pharmacol Biochem Behav 145:55–65. https://doi.org/10.1016/j. pbb.2016.03.010
- Raftery TD, Isales GM, Yozzo KL, Volz DC (2014) High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. Environ Sci Technol 48:804–810. https://doi. org/10.1021/es404322p
- Raftery TD, Volz DC (2015) Abamectin induces rapid and reversible hypoactivity within early zebrafish embryos. Neurotoxicol Teratol 49:10–18. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.02.006
- Ramsay JM, Feist GW, Varga ZM et al (2006) Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture 258:565–574. https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.04.020
- Reif DM, Truong L, Mandrell D et al (2016) High-throughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes. Arch Toxicol 90:1459–1470. https://doi. org/10.1007/s00204-015-1554-1
- 90. Reuter I, Knaup S, Romanos M et al (2016) Developmental exposure to acetaminophen does not induce hyperactivity in zebrafish larvae. J Neural Transm 123(8):841–848
- Ribas L, Valdivieso A, Díaz N, Piferrer F (2017) Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. J Exp Biol 220:1056–1064. https://doi.org/10.1242/ jeb.144980
- 92. Richendrfer H, Creton R, Colwill R (2014) The embryonic zebrafish as a model system to study the effects of environmental toxicants on behavior. Zebrafish Nova Science Publishers, New York, pp 245–264
- 93. Richendrfer H, Pelkowski SD, Colwill RM, Créton R (2012) Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related

behavior in zebrafish larvae. Neurotoxicol Teratol 34:458–465. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.04.010

- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ et al (2011) Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. Neurotoxicol Teratol 33:608–617. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.007
- 95. Rombough P (2002) Role of gills in developing zebrafish. J Exp Biol 205:1787–1794
- 96. Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique, Methuen, London. ISBN 0900767782.https://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc. Accessed 28 Oct 2019
- Russom CL, Lalone CA, Villeneuve DL, Ankley GT (2014) Development of an adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality. Environ Toxicol Chem 33:2157–2169. https://doi. org/10.1002/etc.2662
- Saint-Amant L, Drapeau P (1998) Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. J Neurobiol 37:622–632. https ://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4%3c622:AID-NEU10 %3e3.0.CO;2-S
- Scheil V, Kienle C, Osterauer R et al (2009) Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Ecotoxicology 18:355–363. https://doi. org/10.1007/s10646-008-0291-0
- Schirmer K (2006) Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. Toxicology 224:163–183. https://doi.org/10.1016/j. tox.2006.04.042
- Schmitt C, McManus M, Kumar N et al (2019) Comparative analyses of the neurobehavioral, molecular, and enzymatic effects of organophosphates on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicol Teratol 73:67–75. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.04.002
- 102. Scholz S, Fischer S, Gündel U et al (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environ Sci Pollut Res 15:394–404. https://doi.org/10.1007/ s11356-008-0018-z
- Scholz S, Sela E, Blaha L et al (2013) A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol 67:506–530. https://doi. org/10.1016/j.yrtph.2013.10.003
- Schreiber R, Altenburger R, Paschke A, Küster E (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ Toxicol Chem 27:1676. https://doi.org/10.1897/07-504.1
- Selderslaghs IWT, Hooyberghs J, Blust R, Witters HE (2013) Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. Neurotoxicol Teratol 37:44–56. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.003
- Selderslaghs IWT, Hooyberghs J, De Coen W, Witters HE (2010) Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol 32:460–471. https://doi. org/10.1016/j.ntt.2010.03.002
- Söderpalm B (2002) Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. Eur J Pain 6:3–9. https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0315
- Squires RF, Saederup E, Crawley JN et al (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/ picrotoxin receptor complexes in brain. Life Sci 35:1439–1444. https:// doi.org/10.1016/0024-3205(84)90159-0
- 109. Steele WB, Kristofco LA, Corrales J et al (2018) Comparative behavioral toxicology with two common larval fish models: exploring relationships among modes of action and locomotor responses. Sci Total Environ 640–641:1587–1600. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.402
- 110. Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL (2011) Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. Behav Brain Res 222:15–25. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.025
- Stehr CM, Linbo TL, Incardona JP, Scholz NL (2006) The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. Toxicol Sci 92:270–278. https:// doi.org/10.1093/toxsci/kfj185
- 112. Sun L, Xu W, Peng T et al (2016) Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol 55:16–22. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.003

- Thomas LT, Welsh L, Galvez F, Svoboda KR (2009) Acute nicotine exposure and modulation of a spinal motor circuit in embryonic zebrafish. Toxicol Appl Pharmacol 239:1–12. https://doi.org/10.1016/j. taap.2008.08.023
- 114. Tierney KB (2011) Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. BBA Mol Basis Dis 1812:381–389. https ://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011
- 115. Torres-Hernández BA, Colón LR, Rosa-Falero C et al (2016) Reversal of pentylenetetrazole-altered swimming and neural activity-regulated gene expression in zebrafish larvae by valproic acid and valerian extract. Psychopharmacology 233:2533–2547. https://doi.org/10.1007/s00213-016-4304-z
- 116. Tufi S, Leonards P, Lamoree M et al (2016) Changes in neurotransmitter profiles during early zebrafish (*Danio rerio*) development and after pesticide exposure. Environ Sci Technol 50:3222–3230. https://doi. org/10.1021/acs.est.5b05665
- 117. Velki M, Di Paolo C, Nelles J et al (2017) Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. Chemosphere 180:65–76. https://doi.org/10.1016/j.chemospher e.2017.04.017
- 118. Vliet SM, Ho TC, Volz DC (2017) Behavioral screening of the LOPAC 1280 library in zebrafish embryos. Toxicol Appl Pharmacol 329:241–248. https ://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.011
- 119. Wang Y, Chen J, Du C et al (2014) Characterization of retinoic acidinduced neurobehavioral effects in developing zebrafish. Environ Toxicol Chem 33:431–437. https://doi.org/10.1002/etc.2453
- 120. Watson FL, Schmidt H, Turman ZK et al (2014) Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. Environ Toxicol Chem 33:1337–1345. https://doi.org/10.1002/etc.2559
- 121. Weichert FG, Floeter C, Artmann ASM, Kammann U (2017) Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances—evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. Chemosphere 186:43–50. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.136
- Xia L, Zheng L, Zhou JL (2017) Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio* rerio). Chemosphere 182:416–425. https://doi.org/10.1016/J.CHEMO SPHERE.2017.05.054
- 123. Yang D, Lauridsen H, Buels K et al (2011) Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. Toxicol Sci 121:146–159. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr028
- Yang X, Lin J, Peng X et al (2017) Effects of picrotoxin on zebrafish larvae behaviors: a comparison study with PTZ. Epilepsy Behav 70:224–231. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.03.023
- Yen J, Donerly S, Levin ED, Linney EA (2011) Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. Neurotoxicol Teratol 33:735–741. https://doi.org/10.1016/j. ntt.2011.10.004
- 126. Yozzo KL, Mcgee SP, Volz DC (2013) Adverse outcome pathways during zebrafish embryogenesis: a case study with paraoxon. Aquat Toxicol 126:346–354. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.008
- 127. Zellner D, Padnos B, Hunter DL et al (2011) Rearing conditions differentially affect the locomotor behavior of larval zebrafish, but not their response to valproate-induced developmental neurotoxicity. Neurotoxicol Teratol 33:674–679. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.06.007
- 128. Zimmermann FF, Gaspary KV, Leite CE et al (2015) Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): a developmental behavior analysis. Neurotoxicol Teratol 52:36–41. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.10.002
- 129. Zindler F, Beedgen F, Braunbeck T (2019) Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT)—hidden potential and underestimated challenges. Chemosphere 235:12–20. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.154

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations. RiSKWa – Verbundprojekt NeuroBox Methodische Weiterentwicklung zur Bewertung von neurotoxischen Effekten im Wasserkreislauf



Zusammenfassung und Fazit Verbund

Methodische Weiterentwicklung der dreistufigen In-vitro-Testbatterie zur Erfassung neurotoxischer Wirkungen und Koordination des Verbundes

Förderkennzeichen:	02WRS1419A-F
Projektlaufzeit:	01.03.2017 – 31.12.2020
Projektleiter:	Dr. Tamara Grummt, Jochen Kuckelkorn
Berichtzeitraum:	01.08.2017 – 31.12.2020

Zusammenfassung und Fazit

Die Ergebnisse der Teilprojekte (TP) 1, 3 und 4 führten dazu die bestehende Testbatterie zu modifizieren. Die Untersuchung neuer Zelllinien (Mikrogliazellen oder ihPSC-Neuronen) zeigte, dass die praxisorientierte Nutzung zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht sinnvoll erscheint. Dennoch konnte z.B. der MTT-Test mit neuronalen Stammzellen Neurotoxizität grundsätzlich sehr sensitiv nachweisen. Ähnliches gilt für den Einsatz der -omics, die zwar diverse Einflüsse der Testsubstanzen auf molekularer und verhaltensorientierter Ebene aufzeigen konnten, die entsprechenden Biomarker aber (noch) nicht identifiziert wurden. Sowohl der erweiterte EST (neuronale Differenzierung) als auch die Untersuchungen am Embryomodell konnten die neurotoxische Wirkung von hormon-aktiven Substanzen nachweisen, was die große interaktive Bedeutung dieser Substanzen auf die (frühen) Entwicklungsstadien herausstellt. Der Retina-Assay und der Olfaktorisches Epithel-Assay erwiesen sich als gute Methoden Effekte auf die Sinnesorgane der Fische zu detektieren. Die Übertragung bzw. Verknüpfung dieser Erkenntnisse auf humane neurotoxische Wirkungen müssen jedoch noch validiert werden und stehen noch aus. Auch populationsrelevante Effekte wurden festgestellt, die sich besonders sensitiv in Novel tank Tests nachweisen lassen. Die Erkenntnisse aus TP 3 und TP 5 legen Kombination zudem die von mehreren Testmethoden (molekularbiologisch/verhaltensorientiert) im Rahmen eines Screeningverfahrens nahe. Bei längerer Untersuchungsdauer wird zudem der Einfluss auf die verschiedenen Entwicklungsstadien, z.B. die Motoneuralentwicklung, deutlich. Für das wirkungsbasierte Umweltmonitoring ist der STC gut geeignet, sofern verschiedene, relevante Parameter optimiert aufeinander abgestimmt werden. Zudem ist bei komplexen Umweltproben die additive Wirkung bei ähnlicher Wirkungsrichtung bzw. die antagonistische Wirkung bei unterschiedlichen Wirkmechanismen zu beachten, die mit CA- und IA-Modellen vorhergesagt werden konnte.

Basierend auf den Ergebnissen konnte die bestehende Teststrategie weiter angepasst und optimiert werden. Das Ziel eine standardisierte, sichere und relativ einfache Identifizierung und Bewertung von neurotoxisch aktiven Substanzen im Rahmen des Ressourcenschutzes und der Trinkwassersicherheit zu gewährleisten konnte damit weiter vorangetrieben werden. Die europäische Entwicklung der Trinkwasserrichtlinie fokussiert genau auf diese synergistischen Effekte und zeigt die hohe Relevanz der erzielten Projektergebnisse.

Dennoch zeigten die Ergebnisse auch das weitere Entwicklungspotential zur Überwindung von forschungsorientierten Möglichkeiten und praxisorientierten Bedürfnissen. Das Spannungsfeld aus prinzipiell möglicher Forschung und praxisorientierter Anwendung wurde z.B. durch die Herausforderungen zur Auswahl neuer Zelltypen deutlich. Der Einsatz primärer Zellen, pluripotenter Stammzellen oder hochspezifischer Zelllinien; die Verwendung von -omics; die Übertragung von Ergebnissen aus den Fischembryotests auf die Humantoxikologie; die Bewertung von komplexen Mischungen gegenüber der bestehenden Einzelsubstanzbewertung; all dies sind Beispiele dafür, die bekannte Komplexität von neurotoxischen Wirkungen besser abbilden können. Die Anforderungen an die Labore, die Mitarbeitenden sowie die bisher recht lückenhaften Datensätze stellen jedoch Schwierigkeiten in der regulatorischen Umsetzung dar. Eine vielversprechende Weiterentwicklung stellt der Einsatz von Kokulturen dar, mit denen Effekte auf die Blut-Hirn-Schranke simuliert werden könnten. Die Erfassung endokriner Wirkungen als möglichen Hinweis neurotoxischer Substanzen kann in bestimmten Fällen als weiteres Indiz in der ganzheitlichen Betrachtung herangezogen werden.

Zudem sollten (müssen) zukünftige Bewertungsansätze im europäischen Kontext erstellt werden. Europäische Richtlinien stellen für die Mitgliedsstaaten verbindliche Anforderungen dar, die höchstens verschärft, aber nicht gelockert angewendet werden müssen. Die Verknüpfung europäischer Netzwerke, wie z.B. NORMAN, EurEau oder ENDWARE erscheint unter diesen Prämissen sinnvoll zu sein.