Institut für Biochemie und molekulare Biologie
Unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Kühl

Auswirkungen von Acetamiprid und seinen Formulierungen auf die Embryogenese von *Xenopus laevis*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Marlen Jana Kerner

Geburtsort: Heidenheim an der Brenz

2023

Amtierender Dekan: Prof. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. S. Kühl

2. Berichterstatter: Prof. P. Papatheodorou

Tag der Promotion: 12.12.2025

Teile dieser Dissertation sind erschienen in:

Kerner M, Flach H, Dietmann P, Kühl M, Kühl SJ. The impact of the insecticide acetamiprid on the embryogenesis of the aquatic model organism Xenopus laevis. Environ Toxicol Pharmacol. 2023 Sep 20;103:104278. doi: 10.1016/j.etap.2023.104278. Epub ahead of print. PMID: 37734584.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis IV
Abkürzungsverzeichnis VI
1. Einleitung 1
1.1 Relevanz der Studie 1
1.2 Der Modellorganismus *Xenopus laevis* 2
1.3 Neonicotinoide 7
1.4 Acetamiprid 9
1.5 Acetamiprid-Formulierungen 9
1.6 Ziel der Arbeit 10
2. Material und Methoden 12
2.1 Material 12
2.2 Methoden 23
2.2.1 Umgang mit *X. laevis* 23
2.2.2 Mobilitätsanalyse 26
2.2.3 Isolierung und Auswertung von Gehirnen und Herzen 27
2.2.4 Färbung, Isolierung und Auswertung der Knorpel 28
2.2.5 Antikörperfärbung und Auswertung der Hirnnerven und Herzen 29
2.2.6 Herzfrequenzmessung 30
2.2.7 Methoden für die Whole Mount *in situ*-Hybridisierung 31
3. Ergebnisse 36
3.1 Ergebnisse zu Acetamiprid 36
3.1.1 Mortalität von *X. laevis* unter Einfluss von Acetamiprid 36
3.1.2 Effekt von Acetamiprid auf die Körperlänge von *X. laevis* 36
3.1.3 Auswirkungen von Acetamiprid auf die Mobilität von *X. laevis* 37
3.1.4 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* unter Acetamiprid-Einfluss 39
3.1.5 Effekt von Acetamiprid auf die Augengröße von *X. laevis* 40
3.1.6 Veränderungen Im Kopfbereich von *X. laevis* unter Acetamiprid 41
3.1.7 Einfluss von Acetamiprid auf die Herzen von *X. laevis* 51
3.2 Ergebnisse zum Acetamiprid-haltigen Insektizid Danjiri 57
3.2.1 Effekt von Danjiri auf die Mortalität der *X. laevis* Embryonen 57
3.2.2 Veränderungen der Körperlänge von *X. laevis* nach Inkubation mit Danjiri 57
3.2.3 Darmmorphologie von *X. laevis* nach Kontakt mit Danjiri 59
3.2.4 Effekt von Danjiri auf die Augengröße von *X. laevis* 59
3.2.5 Auswirkungen von Danjiri auf die Kopfmorphologie von *X. laevis* 61

3.2.6 Effekt von Danjiri auf Morphologie und Funktion der *X. laevis* Herzen 63
3.3 Ergebnisse zu dem Acetamiprid-haltigen Insektizid Careo zum Gießen 64
3.3.1 Mortalitätsanalyse der *X. laevis* Embryonen nach Inkubation mit Careo zum Gießen 64
3.3.2 Auswirkungen von Careo zum Gießen auf die Körperlänge von *X. laevis* 64
3.3.3 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* nach Inkubation mit Careo zum Gießen 65
5.3.4 Effekt von Careo zum Gießen auf die Augengröße bei *X. laevis* 66
3.3.5 Auswirkungen von Careo zum Gießen auf die Kopfmorphologie von *X. laevis* 67
3.3.6 Veränderungen der Herzmorphologie von *X. laevis* nach Inkubation mit Careo zum Gießen 70
3.4 Ergebnisse zu Careo Rosenspray 71
3.4.1 Effekt von Careo Rosenspray auf die Mortalität von *X. laevis* 71
3.4.2 Einfluss von Careo Rosenspray auf die Körperlänge von *X. laevis* 72
3.4.3 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* nach Inkubation mit Careo Rosenspray 73
3.4.4 Veränderungen der Augengröße von *X. laevis* nach Inkubation mit Careo Rosenspray 74
3.4.5 Einfluss von Careo Rosenspray auf die Kopfmorphologie von *X. laevis* 75
3.4.6 Effekt von Careo Rosenspray auf die Herzstruktur bei *X. laevis* 77
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 78
4. Diskussion 79
4.1 Relevanz der eingesetzten Stoffkonzentrationen für die Natur 79
4.2 Wirkung des Reinstoffs ACT auf die Mortalität 80
4.3 Acetamiprid beeinflusst Parameter des Aussehens und das Bewegungsmuster von *X. laevis* 80
4.4 Veränderungen der Neuralgewebe von *X. laevis* unter Acetamiprid-Einfluss 83
4.5 Acetamiprid verändert die Herzfunktion und -struktur von *X. laevis* 85
4.6 Vergleich der Auswirkungen von Acetamiprid und seiner Formulierungen 87
5. Zusammenfassung 90
6. Literaturverzeichnis 92
Danksagung 98
Lebenslauf 100

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
ACT	Acetamiprid
actc1	actin alpha cardiac muscle 1
AP	alcaline Phosphatase
Bidest. H_2O	bidestilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
$Ca(NO_3)_2$	Calciumnitrat
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(-Chloramidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
cm	Zentimeter
CRG	Careo Konzentrat zum Gießen
CRR	Careo Rosenspray
DAN	Danjiri
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EC_{50}	effektive Konzentration 50: Konzentration, bei der 50 % der Organismen eine Veränderung zeigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
egr2	early growth response gene 2
EGTA	Ethylenbis(oxythylennitrilo)tetraessigsäure
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumphosphat
L	Liter
LC_{50}	Letale Konzentration 50: Konzentration, bei der 50 % der Organismen sterben
µ	Mikro
MAB	Maleinsäurepuffer
MBSH	modifizierte Barth solution HEPES
MEM	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfatpuffer
MEMFAT	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Formaldehyd/Tween
MEMPFA	MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Paraformaldehyd
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
mhcα	myosin heavy chain α
min	Minute

mL	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MYH6	myosin heavy chain 6
n	Anzahl unabhängiger Experimente
N	Anzahl ausgewerteter Embryonen
N.	*Nervus*
n.s.	nicht signifikant
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Na_3PO_4	Natriumphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
OCM	Oozyten Kulturmedium für Hoden
p	Signifikanzwert
PBS	Polybutylensuccinat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurysulfat
SEM	Standartfehler des Mittelwertes
SSC	saline sodium citrate
St.	Stadium
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung Tween20
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitolester
twist	twist family bHLH transcription factor
U	Units
WMISH	Whole-mount in situ Hybridisierung
X.	*Xenopus*

1. Einleitung

1.1 Relevanz der Studie

Die immer weiter wachsende Bevölkerungszahl der Erde, die steigenden Ansprüche der Menschen an das Nahrungsmittelangebot und der hohe Konsum von tierischen Produkten steigert den Bedarf an Getreiden und anderen Tiernahrungsmitteln immer weiter. Saisonales Obst und Gemüse ist schon lange ganzjährig in unseren Breitengraden verfügbar, da die Menschen beispielsweise Erdbeeren auch im Winter essen möchten. Durch zusätzlich wachsende Konkurrenz im Anbau und Verkauf, greifen viele Landwirte auf Pestizide zurück, um ihren Ertrag zu steigern und vor eventuellem Schädlingsbefall zu schützen. Die steigende Nachfrage nach immer neuen und besseren Pflanzenschutzmitteln hat dafür gesorgt, dass in den letzten Jahrzehnten immer wieder neue Wirkstoffe entwickelt, und auf den Markt gebracht wurden.

Die Studienlage zu den Auswirkungen dieser Stoffe auf die Umwelt und den Menschen ist weitgehend gering, die Anwendung in den meisten Ländern wenig reguliert und kontrolliert. Außerdem gibt es wenige Untersuchungen zu Rückständen der Stoffe in Gewässern und der Erde, und somit zur Belastung der Flora und Fauna.

Trotz der umfangreichen und strengen Regularien in der EU konnten bereits 0,24 ng/L (0,00000024 mg/L) des weltweit angewandten Insektizides Acetamiprid (ACT) in deutschen Gewässern nachgewiesen werden, in den USA sogar bereits 0,0441 mg/L [30, 33]. Aufgrund des schnellen Abbaus von Insektiziden wie ACT und der unterschiedlichen Messzeitpunkte lässt sich jedoch keine Aussage über die Maximalkonzentrationen nach dem Ausbringen der Pestizide treffen. Zudem lassen sich keine oder nur wenige Daten zu ACT-Rückständen aus Entwicklungsländern finden.

Die unklare Rückstandsmenge verschiedener Pestizide wie ACT betrifft vor allem die in der Umgebung beheimatete Flora und Fauna. Dies rückt ein weiteres globales Problem in den Vordergrund: die stetig abnehmende Anzahl an Amphibien. Die Ursachen dafür sind nicht abschließend geklärt, jedoch könnten Pestizide dabei eine Rolle spielen [43].

Direkte Auswirkungen auf die Menschen, die mit den Stoffen täglich arbeiten, sind ebenfalls wenig untersucht. Eine vietnamesische Studie befragte Gemüse- und Reisbauern bezüglich ihres Umgangs mit den Pestiziden und ihres Wissens über deren Wirkungsweise. Zusätzlich erhoben sie die Krankheiten und Krankheitshäufigkeit der Bauern. Hierbei ergab sich, dass nur etwa 8 % der befragten Bauern über die Toxizität ihrer Pflanzenschutzmittel informiert sind, und somit die meisten dieser Landwirte auch nicht angemessen mit ihnen umgehen. Daher nutzen sie beispielsweise wenig Schutzausrüstungen und entsorgen die Reste nicht vorschriftsmäßig [22].

Doch nicht nur die Landwirte selbst sind den Pestiziden ausgesetzt. Rückstände auf Lebensmitteln werden auch von der Allgemeinbevölkerung aufgenommen. Eine Studie sammelte Urinproben von nicht im landwirtschaftlichen Sektor tätiger Menschen und untersuchte sie auf Rückstände von Pestiziden und deren Abbauprodukten. Hierbei konnten bereits bis zu 8,8 µg/L (0,0088 mg/L) von N-desmethyl-Acetamiprid, einem Abbauprodukt von ACT, nachgewiesen werden [34].

Über die Belastungen der Pestizide in der Umwelt und vor allem auf ihre Auswirkungen auf Mensch und Tier ist noch wenig bekannt. Um die Auswirkungen des Insektizids ACT auf das aquatische Leben genauer zu untersuchen, und zeitgleich Schlüsse auf die Auswirkungen auf den Menschen ziehen zu können, wurde für diese Studie der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* als aquatischer Modellorganismus verwendet.

1.2 Der Modellorganismus *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird heutzutage aufgrund seiner vielen Vorteile häufig als Modellorganismus in der Amphibienforschung verwendet. Die Befruchtung der Eier und die gesamte Entwicklung der Embryonen erfolgt außerhalb des Mutterleibes und die Ablage einer großen Anzahl Eier kann zuverlässig durch die subkutane Injektion des menschlichen Schwangerschaftshormones Choriongonadotropin (hCG) induziert werden. Außerdem sind die Eier, dank einer Größe von ca. 1,2 mm, bereits mit einem Lichtmikroskop sichtbar. Die Embryonen entwickeln sich temperaturabhängig innerhalb weniger Tage bis Wochen zu schwimmenden Kaulquappen, in denen

bereits alle Organe angelegt sind. Durch die Metamorphose wird schlussendlich aus der Kaulquappe der adulte Frosch [29].
Durch die durchsichtigen Eihüllen lassen sich zuverlässig 2-Zell-Stadien identifizieren und können einfach in Pestizidlösungen überführt werden [29].
Für die Forschung an den Auswirkungen von Pestiziden ist *X. laevis* außerdem gut geeignet, da er als im Wasser lebendes Amphib selbst direkt von Umweltverschmutzungen betroffen ist. Fast die Hälfte aller Amphibienarten sind vom Aussterben bedroht, und Pestizide könnten hierbei eine Rolle spielen [25].

1.2.1 Die frühe Embryonalentwicklung von *X. laevis*

Da der *X. laevis* ein sehr gut erforschter Modellorganismus ist, ist auch vieles über seine Embryonalentwicklung von der befruchteten Eizelle bis zum adulten Frosch bekannt.
Die Oozyte weist bereits eine sichtbare Teilung auf - einen dunklen animalen Pol und einen helleren vegetalen Pol. Bereits hier sind Proteine, RNA-Moleküle und Lipide asymmetrisch verteilt [29]. Nach der Befruchtung durch die Spermien löst sich die Eizelle von der sie umgebenden Vitellinmembran und durch die asymmetrische Verteilung der Moleküle kommt es zur Drehung der animalen, leichteren Seite nach oben, und vegetalen, schwereren Seite nach unten. Hieran kann man mit bloßem Auge die erfolgreiche Befruchtung der Eizellen erkennen [29].
Die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm werden bereits im späten Blastulastadium im *X. laevis* angelegt. Hierbei entsteht das Ektoderm auf der animalen, das Endoderm auf der vegetalen Seite und das Mesoderm dazwischen [29]. Aus dem Ektoderm entstehen später das Neuralgewebe und die Epidermis, während sich aus dem Endoderm der Urdarm entwickelt. Das Mesoderm bildet später die Somiten, die Extremitäten und das Herz-Kreislaufsystem.
Die Gastrulation (Bildung des Urdarmes) beginnt in Stadium 10. Während dieses Vorgangs werden sich die drei Keimblätter so anordnen, dass der Urdarm letztlich von einer mesodermalen und einer ektodermalen Schicht umgeben ist [29].
Die außen liegende Ektodermschicht bildet in einem Neurulation genannten Prozess das Neuralgewebe. Zunächst entwickelt sich die Neuralplatte, die sich anschließend an einem medialen Gelenkpunkt faltet und so die Neuralfalte bildet. Nach Bildung zweier lateraler Gelenkpunkte formt sich aus der Neuralfalte das

Neuralrohr. Hierbei löst sich das neurale Ektoderm vom epidermalen Ektoderm (Abb. 1) [29].

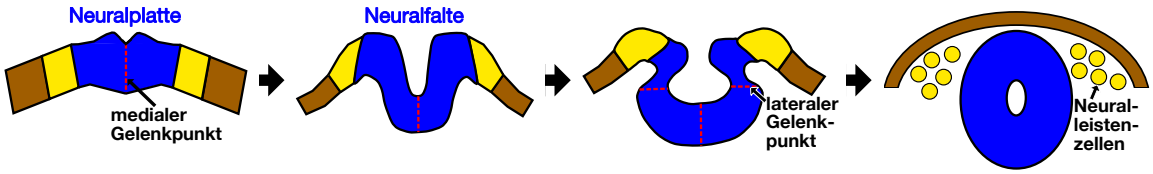

Abb.1 Schematische Darstellung der Neurulation. Die aus dem Ektoderm gebildete Neuralplatte formt sich zur Neuralfalte. Die beiden Enden der Neuralfalte schließen sich zusammen, lösen sich vom umgebenden Ektoderm und bilden das Neuralrohr. [in Anlehnung an [29]]

Ab Stadium 20 bilden sich die Organe im *X. laevis*. Die Bildung ausgewählter, für diese Arbeit relevanter Organe, ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.2.2 Entwicklung des Linsenauges von *X. laevis*

Die Augenbläschen bilden sich bei Vertebraten durch beidseitige Ausstülpung des Diencephalons und bleiben mit diesem durch einen dünnen Stiel verbunden (Augenstiel). Bei *X. laevis* jedoch entstehen die Augen aus einer gemeinsamen Augenanlage im anterioren Neuralgewebe, welche sich im Verlauf der Neurulation aufspaltet. Die Erweiterung des Augenbläschens und das damit verbundene Anlegen an das außen liegende Ektoderm führt zur Induktion der Linsenbildung. Das verbreiterte Linsenbläschen stülpt sich im Verlauf ein und bildet so den nun doppelwandigen Augenbecher. Durch Delamination trennt sich das primäre Linsenbläschen vom restlichen Ektoderm und wandert in den Augenbecher ein. Aus der Wand des Augenbechers entstehen im Verlauf die Retina und das retinale Pigmentepithel, während sich das Linsenbläschen in ein Oberflächenepithel und Linsenfaserzellen differenziert (Abb. 2) [29].

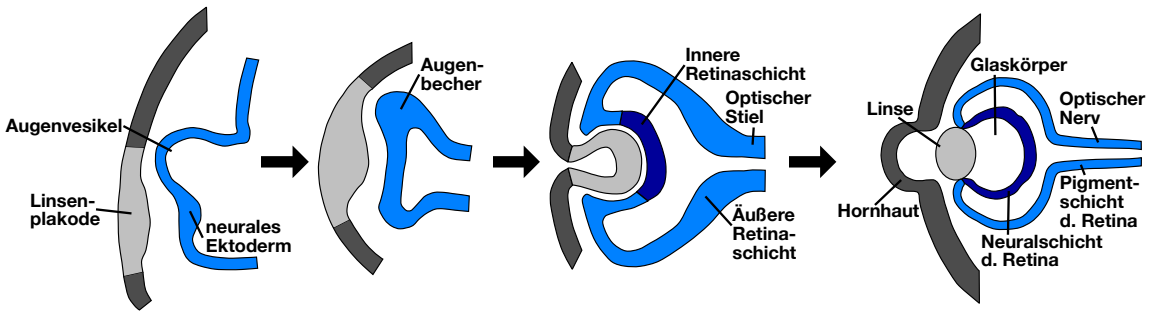

Abb. 2: Schematische Darstellung der Augenentwicklung. Aus dem anterioren Neuralgewebe bildet sich der Augenvesikel, der sich zum doppelwandigen Augenbecher einstülpt. Aus dem darüber liegenden Ektoderm schnürt sich die Linse ab, während der Augenbecher die Retina und den optischen Nerv bildet. [in Anlehnung an [29]]

1.2.3 Hirnnervenentwicklung von *X. laevis*

An der Grenze von Neuralplatte und Epidermis liegt die Neuralleiste. Hier entstehen auch Teile der Hirnnerven. Sobald die Grenze der Neuralplatte induziert wurde, wandeln sich die Neuralleistenzellen von einem epithelialen in einen mesenchymalen Charakter um. Sobald die Umwandlung abgeschlossen ist, lösen sie sich von der Neuralplatte und wandern auf die ventrale Körperseite. Die Hirnnerven entstehen hierbei teilweise aus den Neuralleistenzellen im Kopfbereich des Embryos [29]. Die kranialen Neuralleistenzellen bilden zunächst im Kopfbereich des Embryos vier Bögen. Einen mandibularen, einen hyoidalen und zwei branchiale Bögen [29].

Die zweite Struktur, aus der die Hirnnerven entstehen, sind die Plakoden. Bei den Plakoden handelt es sich um spezialisierte Ektodermregionen, die sich zu Neuronen, Gliazellen und sekretorischen Zellen entwickeln. Wie die Neuralleistenzellen entstehen auch die Plakoden am Rand der Neuralplatte, und sind in der Lage, sich von dieser zu lösen und zu migrieren. Aber im Gegensatz zu den Neuralleistenzellen entstehen Plakoden ausschließlich im Kopfbereich des Embryos. Die verschiedenen Plakoden entwickeln sich zu verschiedenen Organen und Strukturen. So bildet sich zum Beispiel aus der adenohypophysealen Plakode die Adenohypophyse, während aus der olfaktorischen Plakode der *Nervus olfactorius* (*N. olfactorius*) entsteht. Aus anderen Plakoden entstehen Linse und Teile des Innenohrs, sowie Teile von *N. trigeminus*, *N. facialis*, *N. glossopharyngeus* und *N. vagus* (Abb. 3) [35, 36].

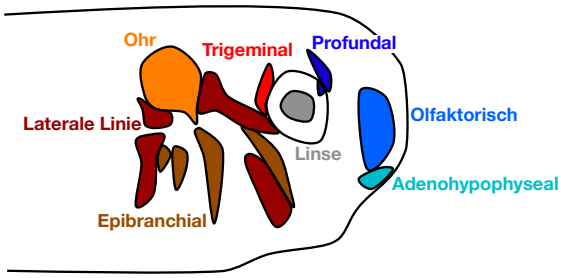

Abb. 3: Schematische Darstellung der Plakoden. Die speziellen Ektodermzellen bilden sich am Rand der Neuralplatte im Kopfbereich des Embryos. Die Plakoden entwickeln sich im Verlauf zu den entsprechenden Organen und Nerven. Aus der epibranchialen Plakode wird beispielsweise der 10. Hirnnerv, während die laterale Linie das Seitenlinienorgan des Frosches bildet. [in Anlehnung an [35]]

1.2.4 Herzentwicklung von *X. laevis*

Die Herzentwicklung aller Wirbeltiere ähnelt einander stark. Sie lässt sich in 6 Phasen einteilen, die sich zeitlich überlappen: als erstes die Spezifikation der kardialen Vorläuferzellen, gefolgt von deren Wanderung an den Ort der Herzbildung. Danach bildet sich ein linearer Herzschlauch und die Schleife. Schlussendlich bildet sich das gekammerte Herz und die Herzkammern reifen [29]. Bei Amphibien, wie dem *X. laevis*, besteht das Herz aus 2 getrennten Atrien (Vorhöfen) und einer Kammer. Da der Gasaustausch in Amphibien nicht nur in der Lunge, sondern auch in der Haut stattfindet, wird kein extra Lungenkreislauf benötigt. Die Kammer ist daher nicht vollständig in 2 Kammern getrennt [29].

Mit Beginn der Gastrulation in Stadium 10, beginnt auch die Entwicklung des Herzens. Die kardialen Mesodermzellen liegen auf beiden Seiten des dorsalen Embryos. Durch Wanderungen bei der Gastrulation bewegen sich die Herzvorläuferzellen auf die Ventralseite. Sobald Stadium 13 erreicht wird, fusionieren die Vorläuferzellen an der ventralen Mittellinie unterhalb der Zementdrüse, um sich im Anschluss sofort in 2 Zelllinien zu teilen: Zellen des ersten Herzfeldes (FHF) und des zweiten Herzfeldes (SHF). Das FHF wird später zu den Atrien und zum Ventrikel, während das SHF zum Ausflusstrakt wird. In Stadium 31-33 bildet sich der Herzschlauch, aus dem sich später die Herzschleife bildet (Abb. 4).

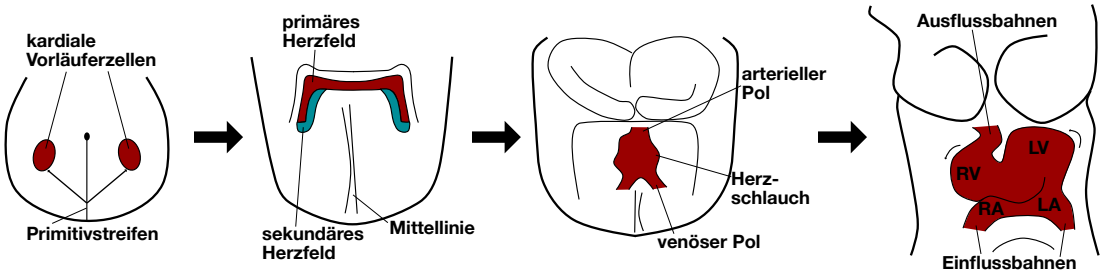

Abb. 4: Schematische Darstellung der Herzentwicklung. Zwei kardiale Herzvorläuferpopulationen rechts und links des Primitivstreifens wandern bei der Gastrulation aufeinander zu. Nach Vereinigung bilden sie das primäre und das sekundäre Herzfeld. Aus diesen Zellen formt sich zuerst der Herzschlauch, aus dem nachher die Herzschleife entsteht. [in Anlehnung an [29]]

Ab Stadium 35 beginnt das Herz zu kontrahieren und in Stadium 40-46 bilden sich die definitiven Kammern mit den Trabekeln [19].

Während der Entwicklung werden verschiedene Gene exprimiert, unter anderem MYH6 (myosin heavy chain 6), welches für *mhcα* (myosin heavy chain α)) kodiert und *actc1* (actin alpha cardiac muscle 1), welche in dieser Arbeit zur Darstellung des sich entwickelnden Herzens verwendet wurden [13].

1.3 Neonicotinoide

Die Substanzklasse der Pestizide lässt sich je nach Wirkmechanismus in verschiedene Gruppen einteilen. Die weltweit bis heute am Häufigsten eingesetzte Substanzklasse bei den Insektiziden sind die Neonicotinoide [10].

Sie sind wasserlöslich und wirken daher systemisch - nach Aufbringen auf die Pflanze dringen sie in diese ein und verteilen sich gleichmäßig von den Wurzeln bis hin zu den Blättern und Früchten [4]. Daher können die Neonicotinoide sowohl als Spritzmittel, als auch als Saatgutbeizmittel eingesetzt werden. Sie finden sogar Anwendung in der Veterinärmedizin als Zecken- und Flohschutz bei Haustieren oder in kommerziellen Fischfarmen als Schutz gegen Wasserflöhe und andere Schädlinge [17, 39].

Die Substanzklasse der Neonicotinoide wurde in den 1980er Jahren entwickelt [39]. Beginnend mit der Substanz Imidacloprid folgten bald auch andere Neonicotinoide, wie Clothianidin, Thiacloprid, Thiamethoxam und Acetamiprid. Sie können nach ihren Strukturformeln in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: N-Nitroguanidine (z.B.: Imidacloprid, Thiamethoxam), Nitromethylene (Nitenpyam) und N-Cyanoamidine (Thiacloprid und Acetamiprid) [17].

Es wird angenommen, dass sie spezifisch an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) im Gehirn von Insekten binden, und dort zu dessen Aktivierung führen, wie beispielsweise auch die Ausschüttung von Acetylcholin [17]. Acetylcholin wird physiologisch von der Acetylcholinesterase abgebaut und das Signal somit beendet. Da sich die Struktur der Neonicotinoide von der von Acetylcholin unterscheidet, kann die Acetylcholinesterase diese nicht abbauen. Daher wird das Signal nicht beendet und es kommt zu einer Dauererregung der Zellen und somit zu Muskelkrämpfen bis hin zum Tod der Insekten (Abb. 5) [4].

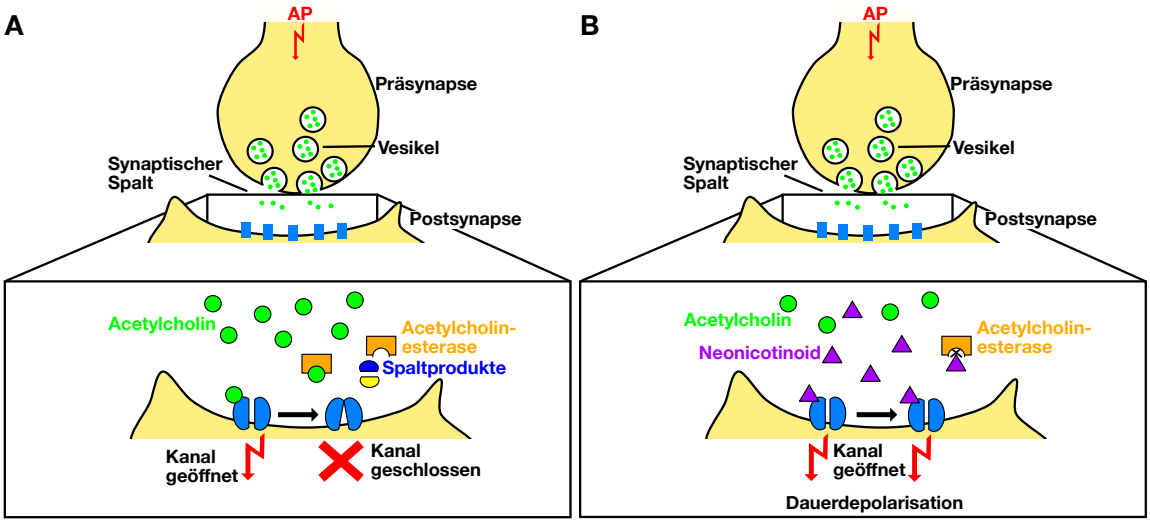

Abb. 5: Wirkmechanismus der Neonicotinoide. A: Acetylcholin wird bei einem ankommenden Signal aus den Vesikeln der Präsynapse in den synaptischen Spalt abgegeben. Es bindet an den nAChR der Postsynapse und aktiviert ihn. Die Acetylcholineresterase baut das Acetylcholin ab und beendet so das Signal. **B:** Die Neonicotinoide binden und aktivieren auch den nAChR, können aber nicht durch die Acetylcholinesterase abgebaut werden. So kommt es zu einer Dauererregung und so zum Tod der Insekten.

Vor allem durch die Ausbringung als Spritzmittel und den unsachgemäßen Umgang mit den Stoffen sind Nicht-Zielorganismen, die im Umkreis der behandelten Felder leben, gefährdet. Durch Auswaschen der Pestizide direkt nach Ausbringung oder aus dem Boden durch Regenfälle und durch fehlerhaften Umgang, wie beispielsweise das Entleeren der Pestizidflaschen in nahen Gewässern, können sich die Stoffe in diesen ansammeln, und so die aquatischen Lebensformen schädigen. Auch der Boden wird mit den Pestiziden durchdrängt und sie können ins Grundwasser gelangen, und so auch den Menschen gefährden [17].

1.4 Acetamiprid

Das Neonicotinoid, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist Acetamiprid (ACT). Dieser Stoff wurde 1989 von der Nippon Soda Corporation in Japan entwickelt. Formulierungen, die diesen Stoff beinhalten, sind weltweit sowie in der EU zugelassen [39].

Bisherige Studien zu ACT haben sich hauptsächlich auf die Auswirkungen auf Nicht-Ziel-Insekten beschränkt. So wurde bereits eine verkürzte Lebenserwartung und weniger häufige Pollenflüge bei exponierten Arbeiterbienen festgestellt [38]. Studien zu aquatischen Organismen sind rar. Eine Arbeitsgruppe fand heraus, dass ACT Auswirkungen auf den Metabolismus von Zebrafischen (*Danio rerio*) hat. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Toxizität von ACT auf Leberzellen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) [28, 46].

Bisher gibt es kaum Studien zu einem möglichen Einfluss von ACT auf die frühe Embryonalentwicklung aquatischer Organismen.

Für den landwirtschaftlichen und privaten Gebrauch von ACT werden hauptsächlich Formulierungen verwendet, die neben dem aktiven Wirkstoff ACT weitere Inhaltstoffe enthalten. Diese Inhaltstoffe sind oftmals für den Verbraucher unbekannt. Durch die unterschiedlichen Zusatzstoffe stellt sich die Frage nach vergleichbaren, kumulativen oder additiven Auswirkungen verschiedener ACT-Formulierungen.

1.5 Acetamiprid-Formulierungen

Eine Formulierung, die ACT als aktiven Wirkstoff enthält, ist unter dem Produktnamen Danjiri (DAN) bekannt. DAN ist ein für die landwirtschaftliche Nutzung zugelassenes Insektizid der Firma Sumi Agro Ltd. Es ist zurzeit in der EU bis zum 28.02.2024 zugelassen [8]. Es handelt sich um ein wasserlösliches Granulat, welches 200 g/kg ACT enthält. Es ist für den Ackerbau, den Gemüse- und Obstanbau, den Weinanbau und den Zierpflanzenanbau zugelassen, wobei die empfohlene Verdünnung und die Häufigkeit der Anwendung für jede Nutzpflanze variiert. So liegen die auszubringenden Konzentrationen zwischen 40 und 250 mg/L ACT [40].

Das Pflanzenschutzmittel „CAREO zum Gießen“ (CRG) ist ein Produkt der Firma Evergreen Garden Care, das weltweit Absatz findet. Im Gegensatz zu DAN ist das Produkt auch für Privatanwender zugelassen, wobei die Zulassung in der EU am 31.10.2023 endet [8]. Es war frei zugänglich in vielen Gartenmärkten oder Online-Shops erhältlich. Es handelt sich um ein Konzentrat, welches 5 g/L ACT enthält und für die Anwendung an Zier- und Nutzpflanzen bestimmt ist. Hierbei soll es auf 280 mg/L ACT verdünnt werden, um die Pflanze damit zu gießen, wobei für 1 L Erde 6 mL CRG in 100 mL Wasser gelöst werden sollen [11].

Ebenfalls ein für Privatanwender weltweit zugelassenes Produkt ist Careo Rosenspray (CRR) der Firma Evergreen Garden Care. Dieses bereits in einer Sprühflasche erhältliche Insektizid ist in der EU bis zum 28.02.2034 zugelassen [8]. Es wird direkt, ohne weitere Verdünnung, auf die Zierpflanzen aufgesprüht und verteilt sich anschließend systemisch in der Pflanze. Es soll aus einer Entfernung von ca. 50 cm auf die bereits mit Schädlingen befallenen Pflanzen aufgesprüht werden, bis diese sichtbar benetzt sind. Bei Bedarf ist eine Wiederholung nach 10 bis 14 Tagen angedacht, wobei nur viermal pro Pflanze und Jahr behandelt werden sollte. Das gebrauchsfertige Spray enthält 50 mg/L ACT und ist auch für die Anwendung in geschlossenen Räumen zugelassen [37].

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der folgenden Arbeit war es, die Auswirkungen von ACT auf die embryonale Entwicklung des aquatischen Organismus *X. laevis* zu untersuchen. Hierfür wurden Embryonen des *X. laevis* in ACT-haltigen Lösungen aufgezogen und anschließend mit Kontrollembryonen verglichen und hinsichtlich morphologischer Veränderungen untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Mobilität der Embryonen gelegt, da in der Natur die Fähigkeit, sich vor Fressfeinden in Sicherheit zu bringen, über Leben und Tod entscheiden kann. Die Mobilität der Embryonen wurde mit einer Mobilitätsanalyse dargestellt. Um die Entwicklung der Nerven und Herzen darzustellen, wurden Antikörperfärbungen angefertigt und ausgewertet. Das Kreislaufsystem wurde mit Hilfe einer Herzfrequenzmessung analysiert. Störungen der frühen Entwicklung wurden mit Hilfe einer Whole mount *in situ* Hybridisierung sichtbar gemacht.

Da die Pestizide oftmals nicht in Reinform angewendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Inhaltsstoffen als Formulierungen erhältlich sind, wurde zusätzlich vergleichend zum Reinstoff die Auswirkungen von drei verschiedenen Formulierungen (DAN, CRG, CRR), die den aktiven Wirkstoff ACT enthalten, untersucht. Hier sollten Unterschiede, die durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen resultieren könnten, analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Der Modellorganismus – *Xenopus laevis*

Die adulten Frösche der Gattung *X. laevis*, aus welchen die Embryonen für die Versuche gewonnen wurden, stammen von der Firma Nasco aus Wisconsin, USA. Sie werden im Tierforschungszentrum der Universität Ulm gehalten. Die Experimente wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Aktenzeichen: 35/9185.82-3) und halten sich an das deutsche Tierschutzgesetz.

2.1.2 Plasmide

Plasmid	**Hersteller**
GFP-MT (#176)	Institut Plasmid Bibliothek
Wnt4/Gem2 (#336)	Institut Plasmid Bibliothek

2.1.3 Enzyme

Enzym	**Hersteller**
Dnase I, Rnase frei	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
RNA Polymerase T7	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
RNase A (Pulverform)	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Rnase Out	ThermoFisher Scientific (Wlatham, MA, USA)
Rnase T1 (100.000 U/mL)	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Spe I	Fa. New England Biolabs Inc. (USA)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	**Hersteller**
3A10 Antikörper	DSHB (Iowa, USA)
Anti-Digoxygenin AP Antikörper	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Anti-Mouse IgG (Cy3-conjugated)	Fa. Dianova (Hamburg, Deutschland)
cardiac troponin T (Tnnt2)	DSHB (Iowa, USA)

2.1.5 *Antisense* RNA Proben

Die *antisense* RNA-Proben der Marker *actc1* (actin alpha cardiac muscle 1), *mhcα* (myosin heavy chain α), *egr2* (early growth response gene 2) und *twist* (twist family bHLH transcription factor) wurden für die Whole-mount in situ Hybridisierung verwendet. Die *mhcα*-Probe wurden von mir selbst hergestellt. Die Sonden für

actc1, egr2 und *twist* wurden von anderen medizinischen Doktoranden und Masterstudierenden aus der Arbeitsgruppe hergestellt.

2.1.6 Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)

2.1.7 Chemikalien

Material	**Hersteller**
Acetamiprid	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Aceticanhydrid	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Fa. Lonza (Basel, Schweiz)
Albumin Bovine (BSA)	Fa. Biofroxx (Einhausen, Deutschland)
Alcianblau 1 %	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Aqua resist	Fa. VWR (Radnor, PA, USA)
bidest. H_2O	Klinikapotheke der Universität Ulm
Blocking Reagenz	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Borsäure	Fa. VWR (Radnor, PA, USA)
Bromphenolblau	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
BM Purple AP	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Calciumchlorid Dihydrat	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Calicumnitrat-Tetrahydrat ($Ca(NO_3)_2$)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chaps	Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
DIG RNA Labeling Mix	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dioxygenin-d´UTP	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Eisessig 5 %	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Ficoll 400	Fa. GE Healthcare (Fairfield, CT, USA)
Formamid	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Formaldehyd 37 %	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fa. ThermoFisher Scientific (Wlatham, MA, USA)
Glutaraldehyd	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Fa. ThermoFisher Scientific (Wlatham, MA, USA)

Heparin	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Horse Serum	Fa. Gibco (Carlsbad, CA, USA)
Ionenaustauscher Serdolit MB-2	Fa. Serva (Heidelberg, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Loading dye solution	Fa. ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)
L-Cysteinchloridmonohydrat (2 %)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat-heptahydrat ($MgSO_4 \bullet 7\ H_2O$)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Maleinsäure	Fa. Roth (Basel, Schweiz)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methylcellulose	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Midori Green Advance	Fa. Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)
3-Morpholinopropan-1-Sulfonsäure (MOPS)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Fa. Honeywell International (Charlotte, NC, USA)
Natriumhydrogenphosphat ($NaHPO_4$)	Fa. VWR (Radnor, PA, USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Fa. VWR (Radnor, PA, USA)
Paraformaldehyd	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Saccharose	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Titriplex III (EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Torula RNA	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
10x Transkriptionspuffer	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Triethanolamin	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Base	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	Fa. Otto Fischar GmbH und Co. KG

2.1.8 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	**Zusammensetzung**
Alcianblau Färbelösung	0,5 g Alcianblau (1 %) 40 mL bidest. H_2O 250 µL Eisessig 0,5 % auf 50 mL mit bidest. H_2O auffüllen
Alkaline Phosphatase Puffer (AP-Puffer)	1 mL 1 M Tris pH 9,5 500 µL 1 M MgCl 200 µL 5 M NaCl 100 µL 10 % Tween auf 10 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
1 % Agarosegel	0,4 g Agarose in 50 mL 1x TBE-Puffer lösen 2 µL Midori-Green zugeben
Blocking-Solution	1 mL 5x MAB/10 % BMB 25 µL 10 % Tween 600 µL Horse Serum auf 5 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
10 % CHAPS	1 g Chaps 10 mL DEPC-H_2O zugeben je 1 mL werden bei -20 °C gelagert
2 % Cysteinchlorid (Enthüllungspuffer)	10 g L-Cysteinchlorid-Monohydrat (2 %) 50 mL 1x MBSH 400 mL 0,1x MBSH zugeben auf pH 8,2-8,4 einstellen (mit NaOH und HCl) auf 500 mL mit 0,1x MBSH auffüllen
Deionisiertes Formamid	1 L Formamid 10 g Ionenaustauscher Serdolit MB-2 eine Stunde rühren, filtern je 50 mL werden bei -20 °C gelagert
50x Denhardts	1 g BSA 1 g Polyvinylpyrrolidon 1 g Ficoll 400 2-3 mL DEPC-H_2O zugeben unter Rühren auf 50 mL mit DEPC-H_2O auffüllen je 10 mL werden bei -20 °C gelagert

DEPC-H_2O	1 L bidest. H_2O 1 mL DEPC über Nacht rühren autoklavieren
0,5 M EDTA	9,3 g EDTA 30 mL DEPC-H_2O zugeben auf pH 8,0 einstellen (mit 10 N) auf 5 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
GeneRuler DNA-Leiter-Mix	100 µL DNA-Leiter-Mix 10 µL 6x Ladefärbelösung 400 µL bidest. H_2O
Heparin	10 mg Heparin in 1 mL DEPC-H_2O lösen je 1 mL werden bei -20 °C gelagert
Hybridisierungspuffer	2 mL deionisiertes Formamid 12,5 mL 20x SSC 1 mL 50x Denhardts 50 µL Heparin (100 mg/mL) 500 µL 10 % Tween 500 µL 10 & Chaps 500 µL 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 50 mL mit DEPC-H_2O auffüllen 50 mg Torula RNA direkt zum Puffer zugeben
5x MAB	29,02 g Maleinsäure 21,90 g NaCl in 400 mL DEPC-H_2O lösen auf pH 7,5 einstellen (mit NaOH) auf 500 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
5x MAB/10 % BMB	5 g Blocking Reagenz auf 50 mL mit 5x MAB auffüllen autoklavieren je 5 mL bei -20 °C lagern
1x MBSH-Puffer	23,5 g 10 mM HEPES 88 mM NaCl 745 mg 1 mM KCl 780 mg 0,33 mM $Ca(NO_3)2$-Tetrahydrat 605 mg 0,41 mM $CaCl_2$-Dihydrat 2,02 mg 0,82 mM $MgSO_4$-Heptahydrat 2,02 g 2,4 mM $NaCO_3$

0,1x MBSH	100 mL 1x MBSH-Puffer auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen
5x MEM	104,65 g MOPS (0,5 M) 3,8 g EDTA (10 mM) 1,23 g $MgSO_4x7H_2O$ (5 mM) in 800 mL bidest. H_2O lösen auf pH 7,4 einstellen auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen 1 mL DEPC zugeben über Nacht rühren, autoklavieren
1x MEMFAT	10 mL 5x MEM 5 mL 37 % Formaldehyd 0,5 mL 10 % Tween auf 50 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
1x MEMPFA	10 mL 5x MEM 5 mL 4 % PFA auf 50 mL mit bidest. H_2O auffüllen
1 % Methylcellulose	2,5 g Methylcellulose 250 mL bidest. H_2O (80 °C) für 10 Minuten rühren, autoklavieren unter Rühren die Lösung auf 4 °C abkühlen, bis sie klar ist (ca. 3 Tage)
1 M MgCl	20,33 g MgCl auf 100 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
5 M NaCl	29,99 g NaCl auf 100 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
10 M NaOH	40 g NaOH auf 100 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
10x PBS	75,95 g NaCl (1,3 M) 12,45 g Na_2HPO_4 (70 mM) 4,14 g Na_2HPO_4 (30 mM) 800 mL bidest. H_2O zugeben auf pH 7,0 einstellen auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen autoklavieren
1x PBS	100 mL 10x PBS auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen

1x PBS + 3 % Horse Serum	1 mL 10x PBS 300 µL Horse Serum auf 10 mL mit bidest. H_2O auffüllen
1x PBS + 20 % Horse Serum	1 mL 10x PBS 2 mL Horse Serum auf 10 mL mit bidest. H_2O auffüllen
1x PBS + 0,3 % Triton X-100	5 mL 10x PBS 150 µL 20 % Triton X-100 auf 50 mL mit bidest. H_2O auffüllen
1x PBS + 0,1 % Tween 20 (PBST)	50 mL 10x PBS 500 µL 10 % Tween auf 500 mL mit bidest. H_2O auffüllen
RNase A (10 mg/mL)	10 mg RNase A in 1 mL 10 mM Tris/HCl pH 8,0/0,1 mM EDTA lösen bei 100 °C für 10 min. kochen auf Eis abkühlen je 100 µL bei -20 °C lagern
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Na_3Citrat in 800 mL bidest. H_2O lösen auf pH 7,0 mit konzentrierter HCl einstellen auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen 1 mL DEPC zugeben über Nacht rühren, autoklavieren
2x SSC	100 mL 20x SSC auf 1 L mit DEPC-H_2O auffüllen
0,2x SSC	100 mL 2x SSC auf 1 L mit DEPC-H_2O auffüllen
10x TBE-Puffer	180 g Tris (ultrarein) 55 g Borsäure 8,3 g Titriplex III auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen

10x TBS	80 g NaCl 2 g KCl 30 g Tris Base in 800 mL bidest. H_2O lösen auf pH 7,4 mit konzentrierter HCl einstellen auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen 1 mL DEPC zugeben Autoklavieren
1x TBST	100 mL 10x TBS 10 mL 10 % Tween auf 1 L mit DEPC-H_2O auffüllen
0,1 M Triethanolamin	750 µL Triethanolamin 100 µL 32 % HCl auf 50 mL mit DEPC-H_2O auffüllen
20 % Triton X-100	20 mL Triton X-100 auf 100 mL mit H_2O auffüllen
1x Tris pH 9,5	12,22 g Tris in 70 mL DEPC-H_2O lösen auf pH 9,5 mit konzentrierter HCl einstellen 100 mL DEPC-H_2O zugeben
10 % Tween 20	50 mL Tween 20 auf 500 mL mit bidest. H_2O auffüllen

2.1.9 Herstellung der Pestizidlösungen

2.1.9.1 Herstellung der Acetamiprid-Lösungen

Zur Inkubation der *X. laevis* Embryonen mit dem Insektizid Acetamiprid (ACT) wurde zunächst eine Stammlösung aus 100 mg/L ACT hergestellt. Diese wurde anschließend in einer Verdünnungsreihe auf 50, 10, 1, 0,1 und 0,01 mg/L verdünnt (Tabelle 1). Für die Phänotyp-Experimente wurden alle Konzentrationen benötigt. Für die Analyse der Knorpel, Hirnnerven, Herzen und Gehirne wurden nur die Konzentrationen 100, 10 und 0,1 mg/L verwendet.

Nach der Herstellung der Lösungen wurde der pH-Wert überprüft. Dieser war mit 7,40 im neutralen Bereich.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Insektizidlösungen mit Acetamiprid (ACT). Die Lösungen enthalten ACT mit Konzentrationen zwischen 0,01 und 100 mg/L.

Konzentration	Verdünnung	Zusammensetzung (für 10 mL Lösung)
100 mg/L	-	1 mg ACT in 10 mL 0,1x MBSH lösen
50 mg/L	1:1	5 mL der 100 mg/L Lösung 5 mL 0,1x MBSH
10 mg/L	1:10	2 mL der 50 mg/L Lösung 8 mL 0,1x MBSH
1 mg/L	1:100	1 mL der 10 mg/L Lösung 9 mL 0,1x MBSH
0,1 mg/L	1:1.000	1 mL der 1 mg/L Lösung 9 mL 0,1x MBSH
0,01 mg/L	1:10.000	1 mL der 0,1 mg/L Lösung 9 mL 0,1x MBSH

2.1.9.2 Herstellung der Danjiri-Lösungen

Die Stammlösung des für den landwirtschaftlichen Gebrauch zugelassenen DAN wurde nach der Konzentration des Reinstoffes ACT hergestellt und enthielt 100 mg/L ACT. Da das Granulat 200 g/kg ACT enthält, wurden für die Stammlösung 17,5 mg DAN-Granulat in 30 mL 0,1x MBSH gelöst. Ebenso wie bei ACT wurden die Konzentrationen 50, 10, 1, 0,1 und 0,01 mg/L verwendet. Diese wurden in derselben Verdünnungsreihe hergestellt, wie die Konzentrationen des Reinstoffes ACT. Die Messung der pH-Werte zeigte Ergebnisse im neutralen Bereich (6,62 bis 6,89).

2.1.9.3 Herstellung der CAREO zum Gießen-Lösungen

Das frei verkäufliche Konzentrat CRG enthält 5 g/L ACT und wurde ebenfalls zu einer Stammlösung mit 100 mg/L ACT verdünnt. Hierfür wurden 700 µL CRG mit 34,3 mL 0,1x MBSH vermischt. Die Verdünnungsreihe wurde ebenso wie beim Reinstoff ACT und bei DAN hergestellt. Die pH-Werte der Lösungen lagen zwischen 6,97 und 7,25.

2.1.9.4 Herstellung der CAREO Rosenspray-Lösungen

Das ebenfalls frei verkäufliche CRR enthält 50 mg/L ACT. Daher konnte keine Stammlösung mit 100 mg/L ACT hergestellt werden. Die Flüssigkeit diente daher ohne Verdünnung als Stammlösung. Die Verdünnungsreihe von 10 bis 0,01 mg/L blieb dieselbe wie die der anderen Stoffe. Auch hier lagen die pH-Werte im nicht toxischen Bereich zwischen 5,20 und 6,79.

2.1.10 Geräte

Material	**Hersteller**
Digitaltimer	Fa. Avantor (Radnor, USA)
Eismaschine	Fa. Scotmans (Vernon Hills, USA)
Feinwaage	Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Fa. Liebherr (Bulle, Schweiz)
Glasröhrchen	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Heizblock	Fa. HLC (Bovenden, Deutschland)
Inkubator WB22K (12,5 °C, 14 °C)	Fa. Mytron (Heilbad, Deutschland)
Kühlschrank (4 °C)	Fa. Liebherr (Biberach a.d.R., Deutschland)
Konfokales Laserscanningmikroskop LSM710	Fa. Zeiss (Wetzlar, Deutschland)
Lichtmikroskop	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Magnetrührer	Fa. Ika (Staufen, Deutschland)
Mikroskop BX60 und MVX10 mit Kameraadapter DP72	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Mikroskop SZH10	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Mikroskop SZX9	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Mini-Zentrifuge	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter 211	Fa. Hanna-Instruments (Vöringen, Deutschland)
Pipetten (10, 20, 200 und 1000 µL)	Fa. HTL (Warszawa, Polen)
Pipettierhilfe	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ringlicht LED	Fa. Optometron (Hofolding, Deutschland)
Roller	Fa. IDL & Co KG (Nidderau, Deutschland)
Schüttler	Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Schwanenhälse	Fa. H. Saur (Reutlingen, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Fa. Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waage	Fa. Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeschrank (37 °C)	Fa. Heraeus (Hanau, Deutschland)
Wasserbad	Fa. Memmert (Büchenbach, Deutschland)
Zentrifuge	Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

acA1300-30gc Kamera	Fa. Baseler (Ahrensburg, Deutschland)

2.1.11 Verbrauchsgegenstände

Material	**Hersteller**
Falcons (15, 50 mL)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Handschuhe M	Fa. Sempermed (Wien, Österreich)
Happy Skin soft Handschuhe M	Fa. Ulma (Neu-Ulm, Deutschland)
Petrischalen	Fa. Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen blau	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen gelb	Fa. Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Pipettenspitzen weiß	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Skalpell	Fa. Braun Aesculap (Melsungen, Deutschland)
Sterilpipetten (5 mL)	Fa. Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Transferpipetten	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (6- und 24-Wells)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)

2.1.12 Software

Software	**Hersteller**
Affinity Designer 1.10.5	Fa. Serif (Nottingham, England)
cellSense Entry 3.1	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Excel 2016	Fa. Microsoft (Redmond, WA, USA)
Ethovision XT 13	Fa. Noldus (Wageningen, Niederlande)
Fiji/ImageJ 69	Fa. Wayne Rasband (USA
GraphPad Prism 9	Fa. Insightful Science (San Diego, CA, USA)
Imaris	Fa. Oxford Instruments (Abingdon, USA)
Pylon viewer (64x)	Fa. Basler (Ahrensburg, Deutschland)
Power Point 2016	Fa. Microsoft (Redmond, WA, USA)
Word 2016	Fa. Microsoft (Redmond, WA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Umgang mit *X. laevis*

2.2.1.1 Gewinnung der Embryonen von *X. laevis*

Zur Gewinnung der Hoden wurde ein Männchen von Ph. D. Studierenden in MS-222 euthanasiert. Die Hoden wurden anschließend entnommen und in Oozyten Kulturmedium (OCM) für zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Am Morgen vor der Gewinnung der Eier wurde ein Drittel des Hodens zerkleinert und durch Zugabe von 1x MBSH eine Hodensuspension hergestellt.

Um die Weibchen zur Eiablage zu stimulieren, wurden ihnen am Vortag vor der Ablage 120-139 µL humanes beta-Choriongonadotropin zwischen Wirbelsäule und Seitenlinienorgan, nahe an der Kloake, gespritzt. Am nächsten Tag konnten die Oozyten durch sanfte extrakorporale Massage des Bauches gewonnen werden.

Die Oozyten wurden in Petrischalen gegeben, das überschüssige Wasser entfernt und mit der zuvor hergestellten Hodensuspension befruchtet (0,1-0,3 mL pro Petrischale). Danach wurde im Verhältnis 1:10 destilliertes Wasser dazugegeben und sanft mit einer Pipettenspitze gemischt. Nach 16 Minuten Befruchtungszeit bei Raumtemperatur wurde 0,1x MBSH in die Petrischale gegeben, bis die befruchteten Oozyten bedeckt waren. Anschließend wurden sie mindestens eine Stunde bei 12,5 °C inkubiert. Um die Cysteinhülle zu entfernen, die die Embryonen umgab, wurden sie mit dem Enthüllungspuffer L-Cysteinchlorid behandelt, der anschließend in mehreren Waschschritten mit 0,1x MBSH wieder entfernt wurde. Danach wurden die Embryonen bei 12,5 °C inkubiert, bis zum Erreichen des 2-Zell-Stadiums.

2.2.1.2 Inkubation der Embryonen mit den Pestiziden

Zur Inkubation der Embryonen in der Pestizidlösung wurden zunächst, wie in Kapitel 4.1.8 beschrieben, die Verdünnungen der Stoffe hergestellt. Diese Lösungen wurden zu je 5 mL in 6-Well-Platten gefüllt, je zwei Wells pro Konzentration. Zusätzlich wurden, als Kontrolle, zwei Wells mit 0,1x MBSH gefüllt. Es wurden jeweils 15 Embryonen (immer nur eines Muttertieres pro Experiment) im 2-Zell-Stadium in ein Well gegeben, wobei je zwei Wells mit einer Konzentration des Stoffes gefüllt wurden. Nach der Inkubation bei 14 °C bis zum gewünschten Stadium, wurden alle toten Embryonen verworfen und die lebenden in MEMPFA

oder MEMFAT fixiert. So konnten später maximal 30 Embryonen pro Konzentration ausgewertet werden (Abb. 6).

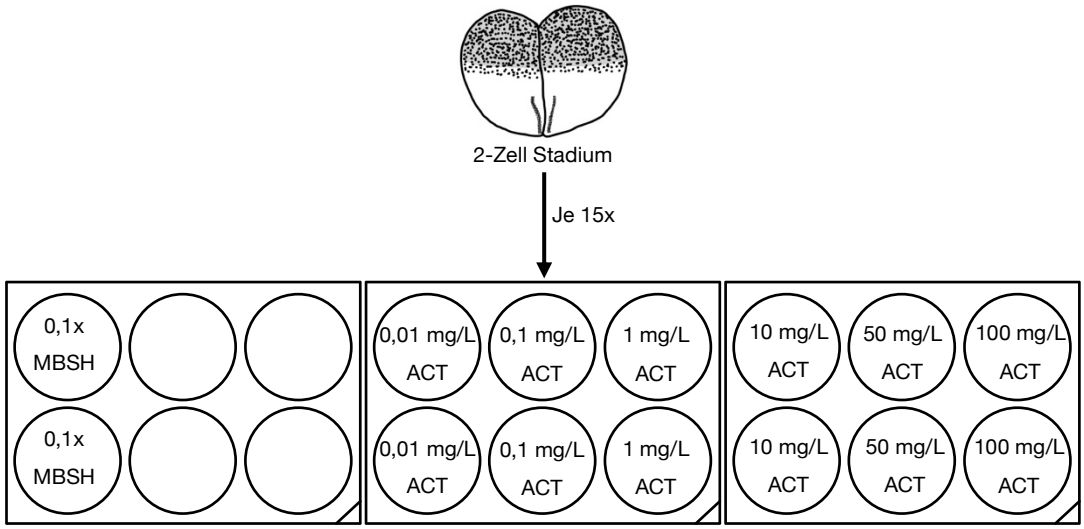

Abb. 6: Schematische Darstellung der Inkubation von *X. laevis*-Embryonen in den Pestizidlösungen. Je 15 Embryonen wurden im 2-Zell-Stadium in die Vertiefungen der 6-Well-Platten pipettiert, welche mit 5 mL der Pestizidlösung in der jeweiligen Konzentration, oder mit 0,1x MBSH als Kontrolllösung befüllt waren. Anschließend wurden die Embryonen bei 14 ºC inkubiert, bis sie das gewünschte Stadium erreicht hatten.

Die Embryonen wurden bis zur Auswertung in 4 mL Glasfläschchen bei 4 °C aufbewahrt.

Die gewünschten Stadien waren 23 und 28 für die WMISH, 45 für die Auswertung des Phänotyps, die Mobilitätsanalyse und die Isolierung der Gehirne und Herzen und 46 für die Isolierung der Knorpel und die Färbung von Hirnnerven. Da die Embryonen in höheren Stadien mehr Platz benötigen, wurden jene, die für das Stadium 46 bestimmt waren, im Stadium 44 in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9,3 cm umgesetzt, die nur 0,1x MBSH enthielten. Danach wurden sie bis zum Erreichen von Stadium 46 bei 14 ºC inkubiert.

2.2.1.3 Auswertung und Dokumentation der Embryonen

Es wurden mindestens vier Experimente jedes Stoffes ausgewertet. Um die Embryonen nach der Fixierung mit 1x MEMFAT auswerten zu können, wurden sie in 1x TBST überführt. Zunächst wurden die Embryonen der Kontrolle in einer Petrischale unter dem Mikroskop analysiert. Waren mehr als 20 % der Embryonen in den Kontrollen, die einen Phänotyp aufwiesen, oder sogar verstorben waren, wurde das gesamte Experiment verworfen. Bei den anderen Experimenten wurde aus den Kontrollen ein repräsentativer Embryo ausgewählt, mit dem daraufhin alle

anderen Embryonen der Kontrolle und der Pestizidlösungen dieses Experiments verglichen wurden. Hierbei wurde auf Veränderungen der Körperlänge, das Auftreten von Darmdeformationen, Veränderungen der Augengröße und der Kopfbreite mit dem Auftreten von Kopfödemen, sowie auf das Auftreten von Herzödemen geachtet. Die aufgetretenen Veränderungen wurden tabellarisch dokumentiert und anschließend mit Excel in prozentuale Verhältnisse zur Gesamtanzahl der Embryonen jeder Konzentration umgerechnet. Die Prozentwerte wurden dann mit dem Programm GraphPad Prism 9 in einem Balkendiagramm dargestellt.

Von jedem Stoff wurden die zwei repräsentativsten Experimente mit insgesamt 180 Embryonen (bei 6 Pestizidkonzentrationen und 1 Kontrolle) ausgewählt, und mit Hilfe eines Olympus Lichtmikroskops und des Programmes cellSense Entry auf einem Agarosegel und in 1 % Methylcellulose mit 1,6x Vergrößerung fotografiert. Anhand dieser Fotos wurden die oben genannten Abweichungen zusätzlich ausgemessen. Die Ausmessungen wurden mit Hilfe von Fiji/ImageJ durchgeführt. Dabei wurde die Körperlänge von der Haftdrüse bis zur Schwanzspitze gemessen (Abb. 7a). Die Kopfbreite wurde als Interokularabstand gemessen (Abb. 7b). Augenfläche (Abb. 7c) und Kopffläche (Abb. 7b) wurden durch Umranden von Auge, bzw. Kopf gemessen.

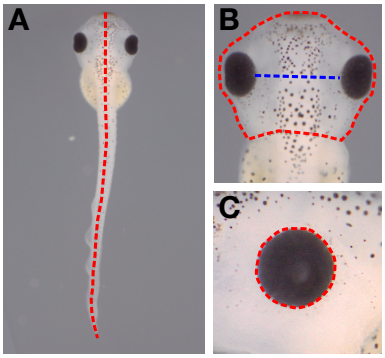

Abb. 7: Darstellung der quantitativen Analyse mittels Fiji/ImageJ. A: Messung der Körperlänge mittels Linientool von der Haftdrüse bis zur Schwanzspitze bei dorsal aufgenommenen Embryonen. **B:** Messung der Kopfbreite in Form des Interokularabstands (blau), ebenfalls mit Hilfe des Linientools bei dorsal liegenden Embryonen. Messung der Kopffläche durch Umrandung des gesamten Kopfes mit dem Flächentool (rot). **C:** Messung der Augenfläche mit dem Flächentool durch Umrandung des Auges von lateral aufgenommenen Embryonen. Bildung des Durchschnitts aus den Flächen beider Augen eines Embryos.

Für die Augenfläche wurde der Mittelwert aus den beiden Augenflächen eines Embryos gebildet. Die Werte wurden in Pixel gemessen, und anschließend in

Millimeter oder Quadratmillimeter umgerechnet. So entspricht beispielsweise bei einer Vergrößerung von 1,6 ein Pixel 288 mm.
Die Messwerte wurden wieder mit Hilfe von GraphPad Prism 9 in eine Statistik überführt.

2.2.2 Mobilitätsanalyse

Um die Einschränkung der Beweglichkeit der Embryonen einschätzen zu können, wurde mit Hilfe einer Mobilitätsanalyse untersucht, welche Strecke die Embryonen in einer gewissen Zeit zurückgelegt haben und welche Durchschnittsgeschwindigkeit sie hatten. Hierfür wurden Embryonen der Kontrollen und der Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L des Reinstoffes bis zu Stadium 44/45 inkubiert. Die Embryonen wurden am Vortag der Mobilitätsanalyse auf Raumtemperatur gelagert, um einen Einfluss der Temperaturveränderung ausschließen zu können.
Jeweils drei Embryonen pro Kontrolle und Konzentrationen wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,2 cm und gefüllt mit 0,1x MBSH gegeben und unter die Kamera (acA 1300-30gc) auf weißen Untergrund gestellt. Anschließend wurden die Schalen mit einem Ringlicht von oben beleuchtet. Die Embryonen wurden durch Einstellen der Kamera scharf gestellt und so beleuchtet, dass das Wasser und die Schale weiß und nur der Embryo dunkel zu sehen war. Die Embryonen wurden dann für 2 Stunden mit dem Programm Pylon Viever 64 bit aufgenommen. Danach wurden die Embryonen ausgetauscht und der Vorgang wiederholt, sodass pro Experiment und Lösung 12 Embryonen aufgenommen wurden.
Nach Abschluss der Aufnahmen wurden diese mit Hilfe des Programmes Ethovision XT 13 ausgewertet. Hierfür wurden die Videos in das Programm geladen und folgende Einstellungen getroffen:
Objekt: fish, zebra fish larvae
Arena: open field, round
Objektanzahl: 3
Mittelpunkt: animal darker than background
Abtastrate: 25 Samples/sec
Auflösung: 1280 x 960

Anschließend wurde das erste Video ausgewählt und die Arena auf die erste Schale eingestellt. Eine Kalibrierungsgerade von 3,2 cm wurde auf die Schale gelegt. Dies wurde für alle Schalen eines Videos und für alle Videos gleichermaßen wiederholt.
Um die Bewegungen der Embryonen auszuwerten, wurde anschließend das Programm auf die Embryonen eingestellt. Zunächst wurde der Startpunkt des Videos nach 2 Sekunden und der Endpunkt nach 2 Stunden gewählt. Damit das Programm die Embryonen erkennen konnte, musste die Graustufe so gewählt werden, dass die Embryonen gut verfolgt werden konnten, ohne dabei den Hintergrund mit einzubeziehen. Um die Einstellung zu kontrollieren, wurde das Video Abschnittsweise untersucht. Die Graustufe wurde für jede Schale und jedes Video individuell festgelegt.
Zur Spurenglättung wurde die Einstellungen „no filter“, „minimal distance moved“ und „direct 1 cm“ getroffen. Das Programm wertete anschließend die Bewegungen der Embryonen aus und trug die Ergebnisse in einer Excel-Tabelle zusammen. Embryonen, die in über 10 % der Zeit nicht detektiert werden konnten, wurden nicht in die Statistik mit einbezogen. Alle anderen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 9 in ein Punktediagramm überführt.

2.2.3 Isolierung und Auswertung von Gehirnen und Herzen

Zur genaueren Analyse von Gehirnen und Herzen wurden diese aus zwei Experimenten isoliert. Hierfür wurden die Embryonen in 1x MEMFAT abgestoppt und anschließend in 1x TBST überführt. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurden Gehirn und Herz aus den Embryonen isoliert. Von jedem Experiment wurden etwa 15 Gehirne und Herzen isoliert. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Olympus Lichtmikroskops und cellSense Entry in 1% Methylcellulose auf schwarzem Hintergrund fotografiert. Hierbei wurden die Gehirne 3,2x und die Herzen 5x vergrößert aufgenommen.
Die Gehirnfläche wurde anschließend mit dem Flächentool von Fiji ausgemessen (Abb. 8).

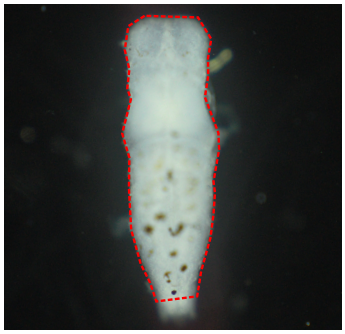

Abb. 8: Darstellung der Gehirnausmessung mit Fiji/ImageJ. Messung der Fläche der isolierten Gehirne mit Hilfe des Flächentools.

Die Herzen wurden anhand der Fotos in makroskopisch normale und Herzen mit veränderter Struktur, Größe und Form eingeteilt. Die Statistiken wurden wieder mit Hilfe von GraphPad Prism 9 erstellt.

2.2.4 Färbung, Isolierung und Auswertung der Knorpel

Es wurden die Knorpel der Embryonen eines Experimentes nach ACT-Behandlung ausgewertet. Hierfür wurden die Embryonen zunächst mit Alcianblau-Färbung nach Gessert *et al.* gefärbt [15]. Dabei wurden sie für 95 Minuten in 4 mL 1 % Alcianblau-Färbelösung bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal für je 1 Stunde und über Nacht mit einer Lösung aus 80 % EtOH/20 % Eisessig gewaschen. Am nächsten Tag wurden sie für 3 Stunden in 30 % H_2O_2 gebleicht und anschließend in 1x TBST überführt. Die Knorpel wurden in einer Schale mit 1x TBST unter dem Mikroskop mit Hilfe von zwei Pinzetten aus den Embryonen isoliert.

Um die Knorpel quantitativ ausmessen zu können, wurden sie in 1 % Methylcellulose ebenfalls mit dem Olympus Lichtmikroskop und cellSense Entry von dorsal 2x vergrößert fotografiert. Anschließend wurde mit Fiji/ImageJ die Fläche der Branchialbögen (Abb. 9 blau), die Breite des Knorpels (Abb. 9 rot), die Fläche des *Tectum anterium* (Abb. 9 lila) und der Winkel der Meckel-Knorpel (Abb. 9 orange) gemessen.

Aus den Flächen der Branchialbögen eines Embryos wurde der Mittelwert berechnet. Die Werte wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 9 statistisch dargestellt.

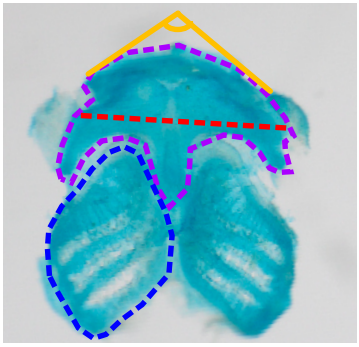

Abb. 9: Darstellung der Knorpelausmessung mit Fiji/ImageJ. Blau: Messung der Fläche der Branchialbögen mit Hilfe des Flächentools. Bildung des Mittelwertes aus beiden Branchialbögen eines Embryos. **Rot**: Bestimmung der Knorpelbreite mit Hilfe des Linientools auf Höhe der breitesten Stelle des *Tectum anterium*. **Lila**: Messung der Fläche des *Tectum anterium* mit Hilfe des Flächentools. **Orange**: Bestimmung des Winkels des Meckel-Knorpels mit Hilfe des Winkeltools. Hierbei wurde immer eine Linie von der Außenkante des Meckelknorpels schräg nach oben bis zur Mitte des Knorpels gezogen. Am Schnittpunkt der beiden geraden wurde der Winkel bestimmt.

2.2.5 Antikörperfärbung und Auswertung der Hirnnerven und Herzen

Zur *in situ*-Analyse von Hirnnerven und Herzen wurden diese in den ganzen Embryonen mit Hilfe von Antikörpern angefärbt. Es wurden nur Embryonen der Kontrolle und der Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L ACT verwendet. Hierfür wurden die Embryonen in Stadium 46 in 1x MEMPFA abgestoppt.

Vor der Färbung wurden diese in 1x PBS überführt und fünfmal rollernd darin gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Embryonen zweimal für 30 Minuten in 1x PBS mit 0,3 % Triton X-100 auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden sie in einer Blocking Solution aus 1x PBS und 3 % Horse Serum für 3 Stunden bei Raumtemperatur blockiert, um anschließend in 500 µL der Antikörperlösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert zu werden (100 µL primärer Antikörper + 2 mL PBS mit 3 % Horse Serum). Als primärer Antikörper für die Färbung der Hirnnerven wurde 3A10, für die Herzen Cardiac Troponin T (Tnnt2) verwendet; beide im Verhältnis 1:20.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen sechsmal für 30 Minuten in 1x PBS auf dem Rollmischer gewaschen. Nach erneuter Blockierung für 1 Stunde in 1x PBS und 20 % Horse Serum wurden die Embryonen mit dem sekundären Antikörper (Cy3 konjugierter Anti-mouse igG) inkubiert. Hierfür wurden die Embryonen in 20 µL Antikörper in 2 mL 1x PBS mit 20 % Horse Serum über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Beide Färbungen wurden mit Hilfe des Olympus Lichtmikroskops unter Fluoreszenzlicht fotografiert. Die Hirnnerven wurden dabei 2x vergrößert von dorsal und ventral aufgenommen, die Herzen 5x vergrößert von ventral und lateral.
Drei dorsale und zwei ventrale Hirnnerven wurden anschließend mit Fiji/ImageJ und dem Längentool ausgemessen. Außerdem wurden die Kopfflächen der Embryonen mit dem Flächentool gemessen, um später die Nervenlänge im Verhältnis zur Kopffläche berechnen zu können (Abb. 10).

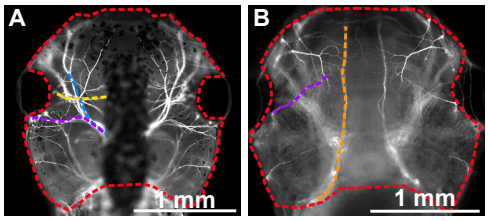

Abb. 10: Darstellung der Hirnnervenmessung mit Fiji/ImageJ. Rot: Messung der Kopffläche mit Hilfe des Flächentools. **A:** Kopf des Embryos von dorsal aufgenommen. **Blau**: Messung des *N. trigeminus*. **Gelb**: Messung des *N. opticus*. **Lila**: Messung des *N. glossopharyngeus*. Alle Nerven wurden mit dem Längentool vermessen. **B:** Aufnahme des Embryos von ventral. **Orange**: Messung des *N. hypoglossus*. **Lila**: Messung des ventralen Teils des *N. glossopharyngeus*. Auch diese Nerven wurden mit dem Längentool vermessen. Anschließend wurden alle Nerven in Relation zur Fläche des Kopfes gesetzt.

Die in Pixel gemessenen Werte wurden wieder entsprechend in mm (bzw. mm^2) umgerechnet und in GraphPad Prism 9 statistisch dargestellt.
Die gefärbten Herzen wurden, wie die isolierten Herzen, nach makroskopisch normal und Struktur, Größe und Form verändert eingeteilt, und anschließend der gleichen Statistik zugeführt.
Exemplarisch wurden je zwei Embryonen jeder Konzentration und der Kontrolle am konfokalen Laserscanningmikroskop LSM710 aufgenommen, um 3D-Bilder der Hirnnerven und der Herzen zu erhalten.

2.2.6 Herzfrequenzmessung

Zur Erfassung der Auswirkungen der Pestizide auf das Kreislaufsystem der Embryonen wurde eine Herzfrequenzmessung der Embryonen der Stoffe ACT, DAN und CRG durchgeführt. Hierfür wurden Embryonen aller Konzentrationen und der Kontrolle bis zum Stadium 44/45 bei 14 °C inkubiert. Vor der Messung der Herzfrequenz wurden sie mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um sie an die veränderte Temperatur zu gewöhnen und so Verfälschungen zu minimieren.

Es wurde eine 6-Well-Platte mit 0,1x MBSH vorbereitet, in die jeweils ein Embryo jeder Konzentration gegeben wurde. Sobald die Embryonen ruhig lagen, wurde unter dem Lichtmikroskop mit einem Klicker 1 Minute lang ihre Herzfrequenz gezählt (bpm). Dies wurde für mindestens 10 Embryonen jeder Konzentration und der Kontrolle wiederholt, wobei darauf geachtet wurde, immer Embryonen verschiedener Konzentrationen gleichzeitig zu untersuchen, um Schwankungen aufgrund des Stadiums oder der Tageszeit gering zu halten. Die Embryonen wurden im Anschluss abgestoppt.
Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und mit Hilfe von GraphPad Prism 9 statistisch dargestellt.

2.2.7 Methoden für die Whole Mount *in situ*-Hybridisierung

2.2.7.1 RNA-Sonden Herstellung für die Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Um später eine Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) durchführen zu können, mussten zunächst entsprechende *antisense* RNA-Proben hergestellt werden.
Hierfür wurden Agarose Gelelektrophoresen zur Überprüfung der einzelnen Schritte und zum Auftrennen der Proben benötigt.
Es wurden 0,4 g Agarose in ca. 50 mL 1x TBE-Puffer abgewogen. Die Lösung wurde anschließend immer wieder kurz aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Danach wurden 2 µL Midori Green zugegeben und die Lösung vorsichtig geschwenkt. In die kleine Gelkammer wurden ein Kamm und zwei Spacer gegeben, bevor die fertige Agaroselösung zugegeben wurde. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur war das Gel ausgehärtet und die Spacer und der Kamm konnten entfernt werden.
Nun wurde das Gel mit 1x TBE-Puffer bedeckt, sodass die ganze Kammer gefüllt war. Die Proben, die zuvor mit 10x Proben-Ladepuffer gemischt wurden, wurden nun in die Geltaschen gegeben, die Spannung angeschlossen und für 20 Minuten bei 80-100 Volt aufgetrennt.

Zur Generierung der RNA-Transkripte für die WMISH wurden die entsprechenden DNA-Fragmente für *mhca* zunächst linearisiert. Hierfür wurde eine Linearisierungslösung mit den folgenden Inhaltsstoffen hergestellt:

5 µg DNA
2 µL 10x Puffer
2 µL SpeI Enzym
auffüllen auf 20 µL mit DEPC-H_2O
Die Lösung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.
Am nächsten Morgen wurde ein Kontrollgel (Agarose Gel Elektrophorese) angefertigt, um zu überprüfen, ob die Linearisierung erfolgreich war. Hierfür wurde 1 µL der Probe mit 3 µL ddH_2O und 1 µL Ladepuffer auf einer Titerplatte gemischt und auf das Gel aufgetragen.
Im Falle von *mhca* musste eine Fragmentisolierung vorgenommen werden. Hierfür wurde die gesamte Probe mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde herausgeschnitten und die Probe mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von der Agarose getrennt (siehe QIAquick Gel Extraction Kit Protocol der Firma Qiagen).
im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Proben mit 15 µL DEPC-H_2O eluiert und ein weiteres Kontrollgel angefertigt, um die DNA-Menge abschätzen zu können. Hierfür wurden je 1 µL Probe pro Spur aufgetragen.
Anschließend wurde die DNA transkribiert, um RNA zu erhalten. Hierfür wurden
1 µg der linearisierten DNA
2 µL RNA Labeling Mix
2 µL 10x Transkriptionspuffer
1 µL RNA-Polymerase T7 und
1 µL RNase Out (RNase Inhibitor)
gemischt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.
Anschließend wurden 2 µL DNase RNase frei dazugegeben, um die restliche DNA zu zersetzen, und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.
Ein anschließendes Kontrollgel diente der Überprüfung der Transkription (1 µL/Spur).
Zum Abschluss wurde die Probe mit Hilfe einer G 50 Säule aufgereinigt. Hierfür wurde die Säule 1 Minute bei 2.900 rpm zentrifugiert, wobei eine Schrägfläche entstand. Auf diese Schrägfläche wurde anschließend die Probe pipettiert, und bei 2.900 rpm für 2 Minuten zentrifugiert.

Ein letztes Kontrollgel wurde angefertigt, bei erfolgreicher Aufreinigung wurden 1,5-2 µL Hybridisierpuffer auf die fertige Sonde gegeben und bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.2.7.2 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

In dieser Arbeit wurden jeweils zwei Experimente der mit dem Reinstoff ACT behandelten Embryonen auf die Wanderung der Neuralleistenzellen und die Differenzierung der Herzmuskelzellen untersucht. Für diese Untersuchung wurde die Methode der Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) verwendet. Für die Untersuchung der Neuralleistenzellen wurden die spezifischen Markergene *egr2* und *twist*, für die Herzmuskelzellen die Marker *mhcα* und *actc1* verwendet. Es wurden Embryonen der Kontrolle und in 0,1, 10 und 100 mg/L ACT inkubierte Embryonen verwendet.

Zu Beginn der WMISH wurden die mit 1x MEMFAT fixierten Embryonen in 1x TBST übertragen. Die Embryonen wurden 10 Minuten in 0,1M Triethanolamin inkubiert, anschließend wurden zweimal 2,5 µL Aceticanhydrid zugegeben und für je 5 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der letzten 5 Minuten wurde die Lösung vollständig abgenommen und die Embryonen zweimal für 5 Minuten in 4 mL 1x TBST auf dem Rollmischer inkubiert. Daraufhin wurden die Embryonen in 300 µL MEMFAT für 30 Minuten fixiert und einmal 5 und einmal 10 Minuten in 4 mL 1x TBST auf dem Rollmischer inkubiert.

Anschließend wurde die Vorhybridisierung durchgeführt. Dafür wurde das 1x TBST bis auf einen kleinen Überstand abgenommen und 300 µL Hybridisierpuffer zugegeben, bis sich die Embryonen abgesetzt hatten. Anschließend wurde die Lösung vollständig abgenommen, nochmals 300 µL Hybridisierpuffer auf die Embryonen gegeben und bei 65 °C für ca. 4 Stunden im Wasserbad inkubiert.

Nach Ablauf der 4 Stunden wurde die Sonde für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, der Hybridisierpuffer vollständig von den Embryonen abgenommen, die Sonde auf die Embryonen gegeben (etwa 300-500 µL) und über Nacht bei 65 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Sonde abgenommen und bei -20 °C gelagert (Sonden können bis zu 15x verwendet werden). Anschließend wurden die Embryonen gewaschen. Hierfür wurden sie mehreren Waschschritten unterzogen: 15 Minuten

Inkubation in 300 µL Hybridisierpuffer bei 65 °C, 30 Minuten bei 65°C in 1 mL 2x SSC, 40 Minuten in 1 mL 2x SSC + 0,05 % Tween + 20 µg/mL RNase A + 10 U/mL RNase T1 bei 37 °C, 15 Minuten in 1 mL 2x SSC + 0,05 % Tween bei 65 °C und ein weiteres Mal 30 Minuten in 1 mL 0,2x SSC + 0,05 % Tween bei 65 °C. Anschließend wurden die Embryonen zweimal für 10 Minuten in 1x TBST bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert.
Danach wurden die Embryonen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 500 µL Blocking Solution inkubiert, während parallel bereits der Anti-Digoxygenin-Antikörper in Blocking Solution auf dem Rollmischer inkubiert wurde (1 µL Antikörper auf 10 mL Blocking Solution). Nach Ablauf der Stunde wurde die Blocking Solution von den Embryonen abgenommen und je 500 µL des blockierten Antikörpers auf die Embryonen gegeben und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Antikörper abgenommen und die Embryonen über Nacht in 4 mL 1x TBST bei 4 °C gelagert.

Am dritten Tag wurden die Embryonen gewaschen. Hierfür wurden sie zweimal für 45 Minuten und einmal für 60 Minuten in 4 mL 1x TBST auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden sie in eine 24-Well-Platte überführt. Auf die Embryonen wurde für 10 Minuten 1 mL AP-Puffer gegeben.
Zum Abschluss wurden die Embryonen gefärbt. Es wurden 500 µL BM Purple AP Substrat in die Wells gegeben und im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Färbung wurde mit 1x MEMFAT abgestoppt und die Embryonen bei 4 ° bis zum Bleichen gelagert.
Um sie zu bleichen wurden die Embryonen in 30 % H_2O_2 für 2-3 Stunden inkubiert. Das H_2O_2 wurde entfernt und die Embryonen in 1x TBST bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert.

2.2.7.3 Auswertung der WMISH gefärbten Embryonen

Alle WMISH gefärbten Embryonen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und nach Veränderungen in der Expression der Markergene eingeteilt.
Die *mhca*-Embryonen wurden für eine genauere quantitative Analyse zusätzlich in 2x Vergrößerung in Schwarz-Weiß aufgenommen und die Fläche und Intensität der Expression ausgemessen. Mittels Fiji/ImageJ wurde die Region der Expression mit

dem Flächentool ausgewählt. Via Threshold konnte nun die Fläche der Expression und die Intensität der Expression ausgemessen werden. Die erhobenen Daten wurden anschließend mit Hilfe von GraphPad Prism 9 statistisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zu Acetamiprid

3.1.1 Mortalität von *X. laevis* unter Einfluss von Acetamiprid

Embryonen von *X. laevis* wurden während ihrer Entwicklung vom 2-Zell-Stadium bis zum Stadium 45 in Acetamiprid (ACT) Lösungen inkubiert, wobei die Konzentration von ACT von 0,01 über 0,1, 1, 10 und 50 bis 100 mg/L reichte. Die mit ACT behandelten Embryonen wurden mit Kontrollembryonen verglichen, die in einer Lösung aus 0,1x MBSH inkubiert wurden. Es konnte in keiner der Konzentrationen eine erhöhte Sterblichkeit der Embryonen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 11).

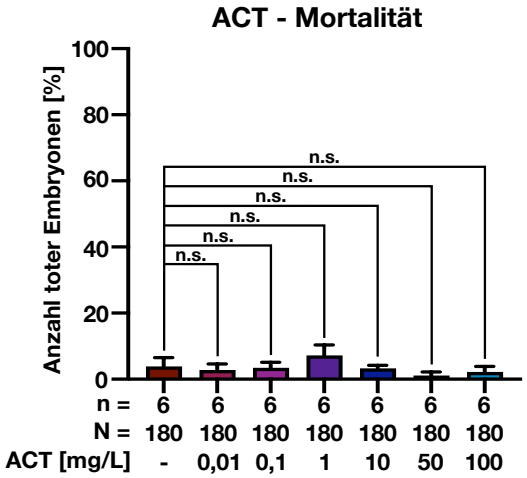

Abb. 11: Statistische Auswertung der Sterblichkeitsrate von *X. laevis* Embryonen in Prozent. Es wurden sechs unabhängige Experimente ausgewertet. Verglichen wurde die Sterblichkeitsrate der Kontrollembryonen mit der Sterblichkeitsrate der mit 0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L ACT behandelten Embryonen. Es zeigt sich keine signifikante Steigerung der Mortalität bei den mit ACT behandelten Embryonen. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.2 Effekt von Acetamiprid auf die Körperlänge von *X. laevis*

Um eventuelle Auswirkungen, die ACT auf die äußere Entwicklung der *X. laevis* Embryonen haben könnte, darzustellen, wurden die Embryonen sechs unabhängiger Experimente unter dem Mikroskop zunächst nach ihrer Körperlänge beurteilt, wobei alle Embryonen mit einem repräsentativen Kontrollembryo des jeweiligen Experimentes verglichen wurden. Zwei dieser Experimente, die am repräsentativsten in Bezug auf ihren morphologischen Phänotyp waren, wurden

anschließend fotografiert und quantitativ analysiert. Unter dem Lichtmikroskop zeigte sich keine signifikante Verkürzung der Embryonen, wobei aber eine Tendenz mit steigender ACT-Konzentration erkennbar war (Abb. 12 B). In der quantitativen Analyse zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Embryonen ab einer Konzentration von 10 mg/L ACT (Abb. 12 C).

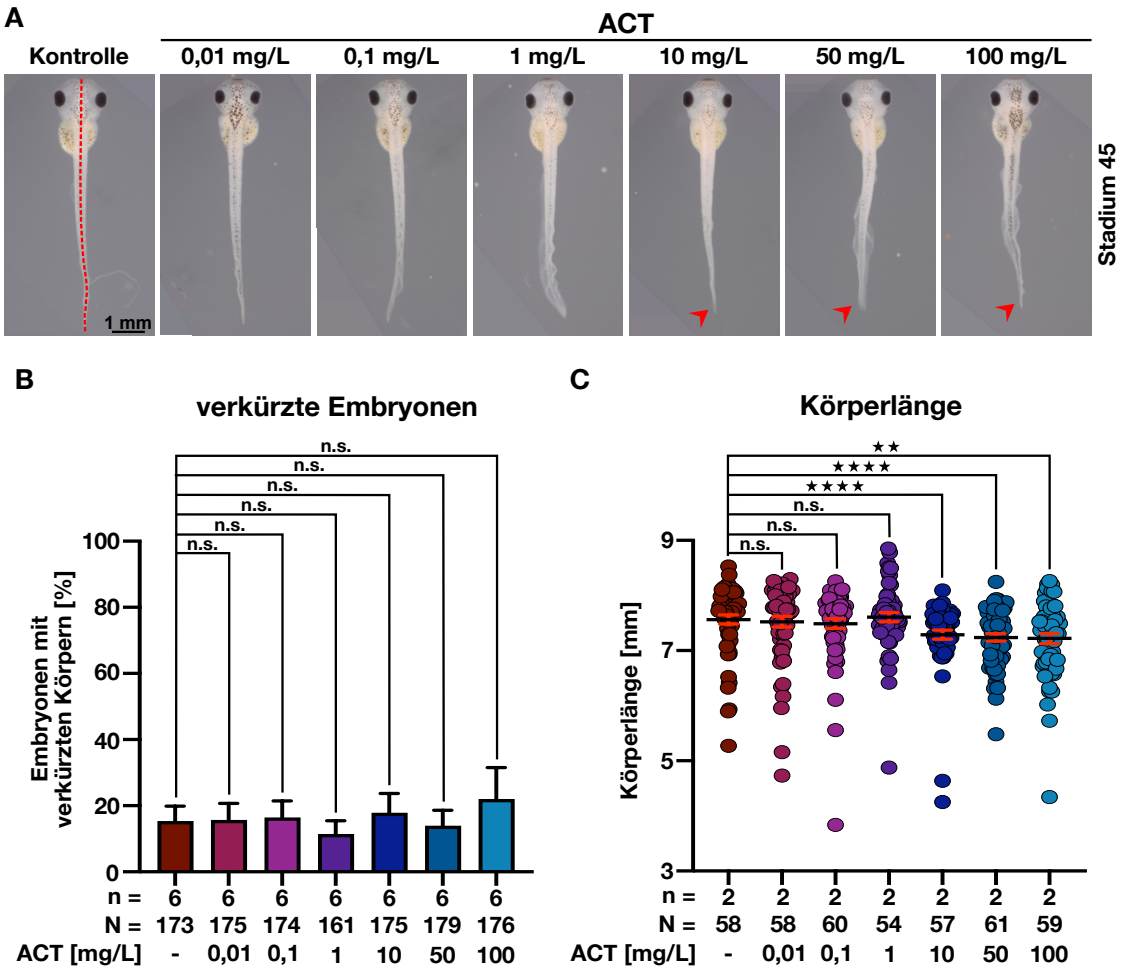

Abb. 12: Körperlänge der Embryonen nach ACT-Inkubation. A: Dorsale Aufnahmen von Embryonen der Kontrolle und der ACT-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L) **B:** Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Experimenten, Darstellung der Embryonen mit verkürzten Körperlängen in Prozent. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung. **C:** Statistische Darstellung der Körperlängen von zwei unabhängigen Experimenten in mm. Messung der Körperlänge entlang der roten Linie (in A). Ab 10 mg/L sind die Embryonen signifikant verkürzt (rote Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, **: $p\leq0,01$, ****: $p\leq0,0001$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.3 Auswirkungen von Acetamiprid auf die Mobilität von *X. laevis*

Die Fähigkeit, sich von Fressfeinden zu entfernen, ist essentiell für das Überleben der Kaulquappen und daher für den Erhalt der ganzen Art. Ob das

Schwimmverhalten der Embryonen durch Kontakt mit ACT beeinflusst wird, wurde mit Hilfe einer Mobilitätsanalyse untersucht. Hierbei wurden je zwölf Embryonen der Kontrolle und der Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L ACT zweier unabhängiger Experimente für zwei Stunden gefilmt, und die zurückgelegte Strecke (Abb. 13 B) und die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit (Abb. 13 C) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Embryonen der Konzentrationen 0,1 und 10 mg/L tendenziell weitere Strecken zurücklegen und schneller schwimmen als die Kontrollen. Die mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen dagegen schwammen signifikant langsamer und kürzere Strecken.

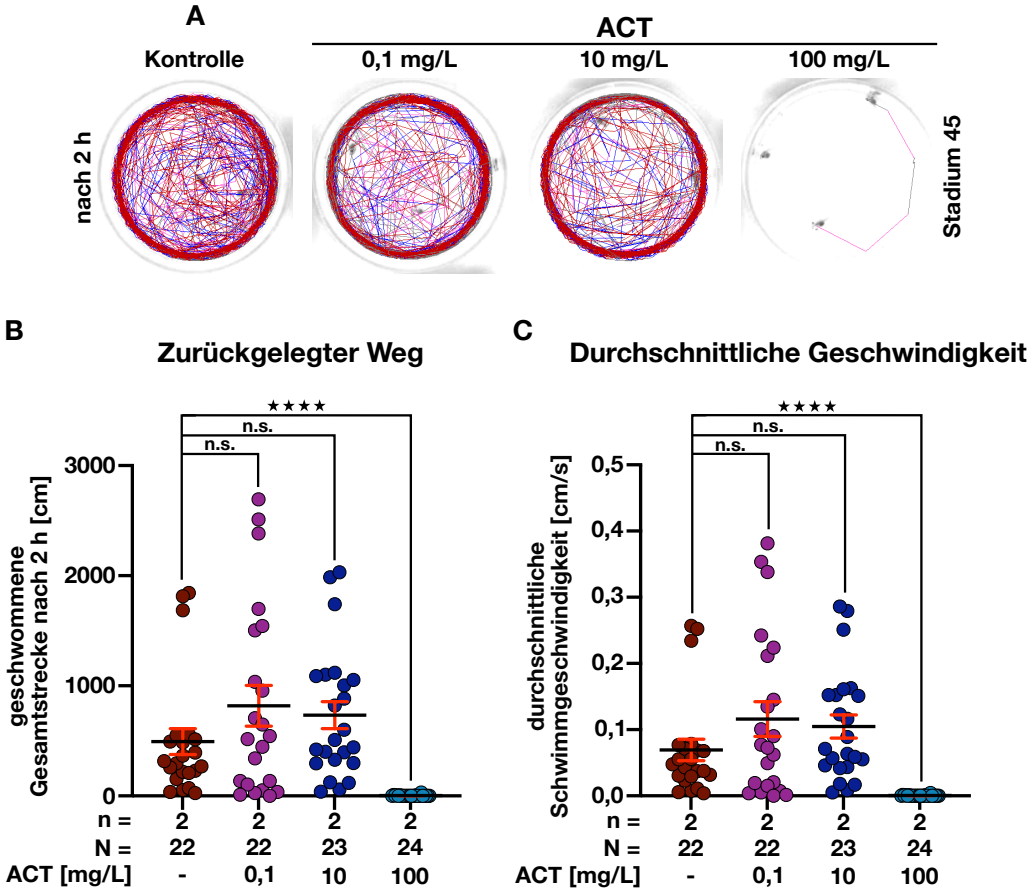

Abb. 13: Schwimmverhalten der Embryonen nach ACT-Inkubation. A: Grafisch dargestelltes Schwimmverhalten exemplarisch ausgewählter Embryonen der Kontrollen und der ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L **B:** Zwei unabhängige Experimente wurden statistisch ausgewertet. Es zeigt sich eine signifikant geringere Strecke bei mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen verglichen mit der Kontrolle. **C:** Statistische Darstellung der durchschnittlichen Schwimmgeschwindigkeit der Embryonen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der mit 100 mg/L ACT inkubierten Embryonen ist im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verringert. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, ****: $p\leq0,0001$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.4 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* unter Acetamiprid-Einfluss

Um den Einfluss von ACT auf die äußere Erscheinung von *X. laevis* Embryonen weiter zu untersuchen, wurden unter dem Lichtmikroskop verschiedene Organe betrachtet. Hier wurde auch der Darm der Embryonen untersucht und die Embryonen der ACT-Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L mit den Embryonen der 0,1x MBSH-Kontrolle verglichen (Abb. 14 B). Hierbei zeigten sich bei den mit 50 und 100 mg/L behandelten Embryonen signifikant mehr Embryonen, deren Därme nicht stadiengerecht gedreht und rotiert waren, als bei den Kontrollen. Es fehlte die für dieses Stadium charakteristische S-förmige Drehung des oberen Darmabschnittes und der gesamte Darm ist nicht um etwa 90 ° rechtsgedreht, sondern um ca. 45 ° linksgedreht.

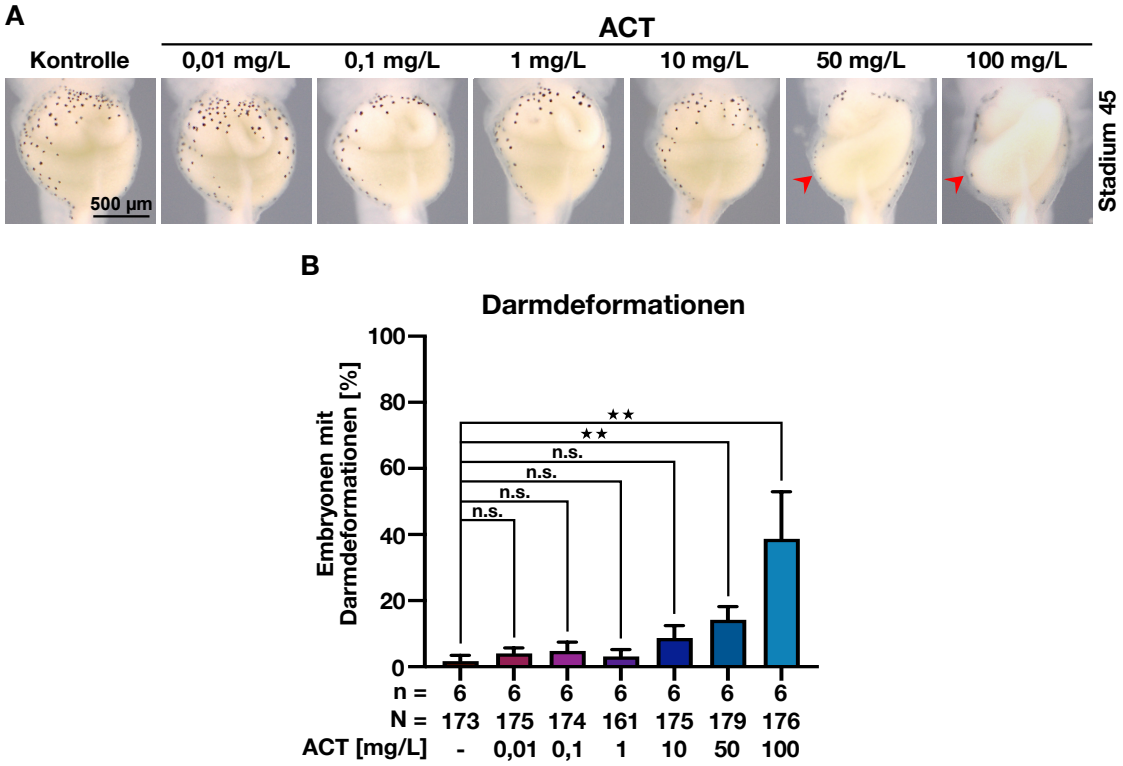

Abb. 14: Auftreten von Darmdeformationen bei ACT-behandelten Embryonen im Stadium 44. **A:** Bilder ventral fotografierter Embryonen der Kontrollen und der Embryonen der ACT-Konzentrationen 0,01, 0,1 1, 10, 50 und 100 mg/L mit Fokus auf die Intestinalregion. **B:** Auswertung von sechs unabhängigen Experimenten unter dem Lichtmikroskop. Dargestellt sind die Embryonen mit deformierten Därmen in Bezug zur Gesamtanzahl in Prozent. In den mit 50 und 100 mg/L ACT behandelten Gruppen ist die Anzahl an Darmdeformationen signifikant höher als in der Kontrolle. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, **: $p\leq0,01$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.5 Effekt von Acetamiprid auf die Augengröße von *X. laevis*

Die korrekte Entwicklung der Augen stellt einen wichtigen Anteil für das Überleben der Embryonen dar, da das Sehvermögen wichtig für die Orientierung der Kaulquappen ist. Um diese zu untersuchen, wurden die Augen der mit 0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L ACT behandelten Embryonen zunächst unter dem Mikroskop mit denen der Kontrolle verglichen (Abb. 15 B). Anschließend wurden zwei repräsentative Experimente ausgewählt und die Augengröße vermessen (Abb. 15 C). Die Augenfläche der Embryonen war bereits ab 1 mg/L ACT signifikant verkleinert.

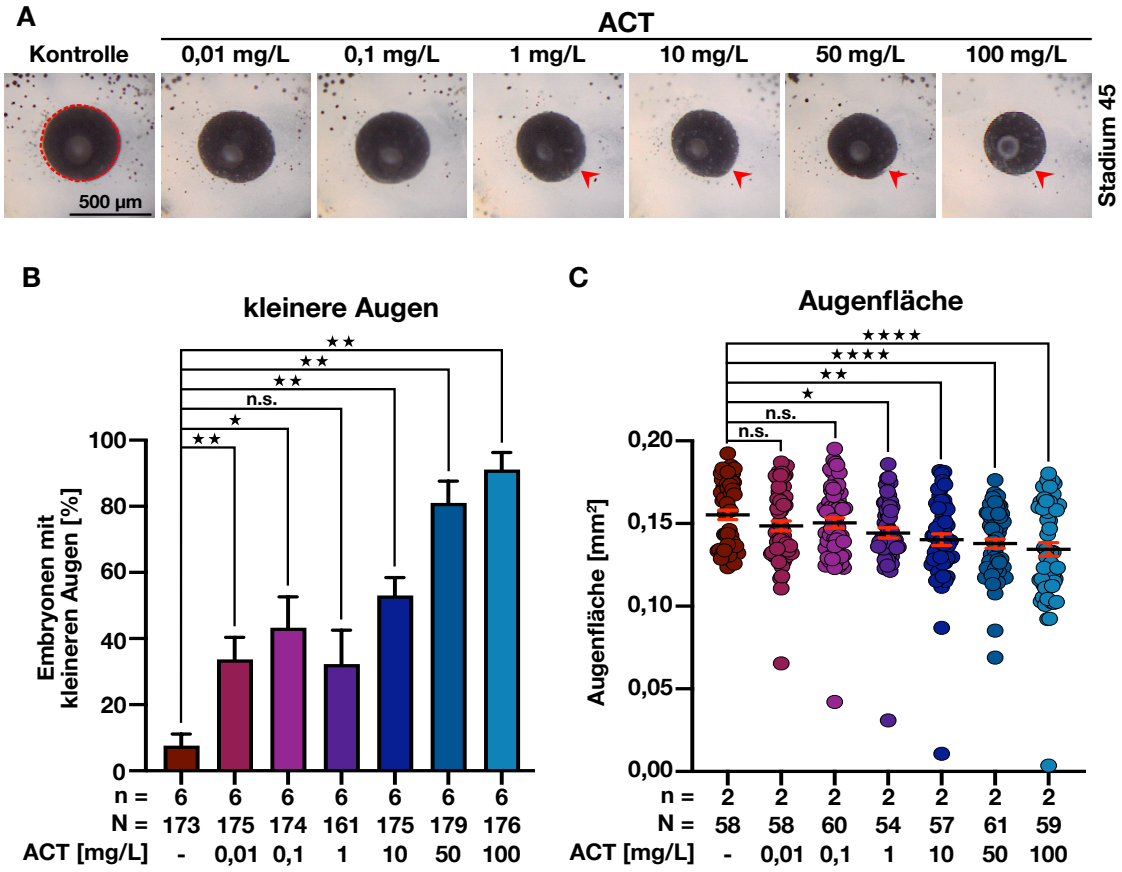

Abb. 15: Phänotyp der Augen von ACT behandelten Embryonen. A: Fotos der Augen lateral liegender Embryonen der Kontrollen und der ACT-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L). **B:** Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Experimenten nach dem Anteil der Embryonen mit verkleinerten Augen in Prozent. Die Embryonen wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Alle ACT-Konzentrationen haben signifikant mehr Embryonen mit kleineren Augen mit Ausnahme von 1 mg/L ACT im Vergleich zu den Kontrollen. **C:** Gemessene Augenfläche der Embryonen (rote Linie in A) von zwei unabhängigen Experimenten. Ab 1 mg/L ACT zeigen die Embryonen verglichen mit der Kontrolle signifikant kleinere Augen (rote Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05, *: p≤0,05, **: p≤0,01, ****: p≤0,0001
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.6 Veränderungen Im Kopfbereich von *X. laevis* unter Acetamiprid

3.1.6.1 Effekt von Acetamiprid auf die Kopfmorphologie von *X. laevis*

Neben der Analyse der Augen wurde auch allgemein der Kopf der Embryonen betrachtet. Unter dem Lichtmikroskop wurde das Auftreten von Kopfödemen (Abb. 16 A, obere Reihe) und die Kopfbreite (Abb. 16 A, untere Reihe) beurteilt. Ab 50 mg/L ACT treten signifikant mehr Kopfödeme auf als in der Kontrolle (Abb. 16 B). Signifikant mehr Embryonen der Konzentrationen 1, 10 und 50 mg/L ACT zeigten kleinere Köpfe im Vergleich zu den Embryonen der Kontrolle (Abb. 16 C).
Um die Größe der Köpfe zu quantifizieren, wurden die Kopfflächen (Abb. 16 D) und der Interokularabstand (Abb. 16 E) von zwei unabhängigen Experimenten vermessen. Hierbei zeigte sich bei den mit 1 und 10 mg/L ACT behandelten Embryonen eine signifikant kleinere Kopffläche als bei den Kontrollen. Der Interokularabstand der in 10 mg/L ACT inkubierten Embryonen war, verglichen mit den Kontrollen, ebenfalls kleiner.

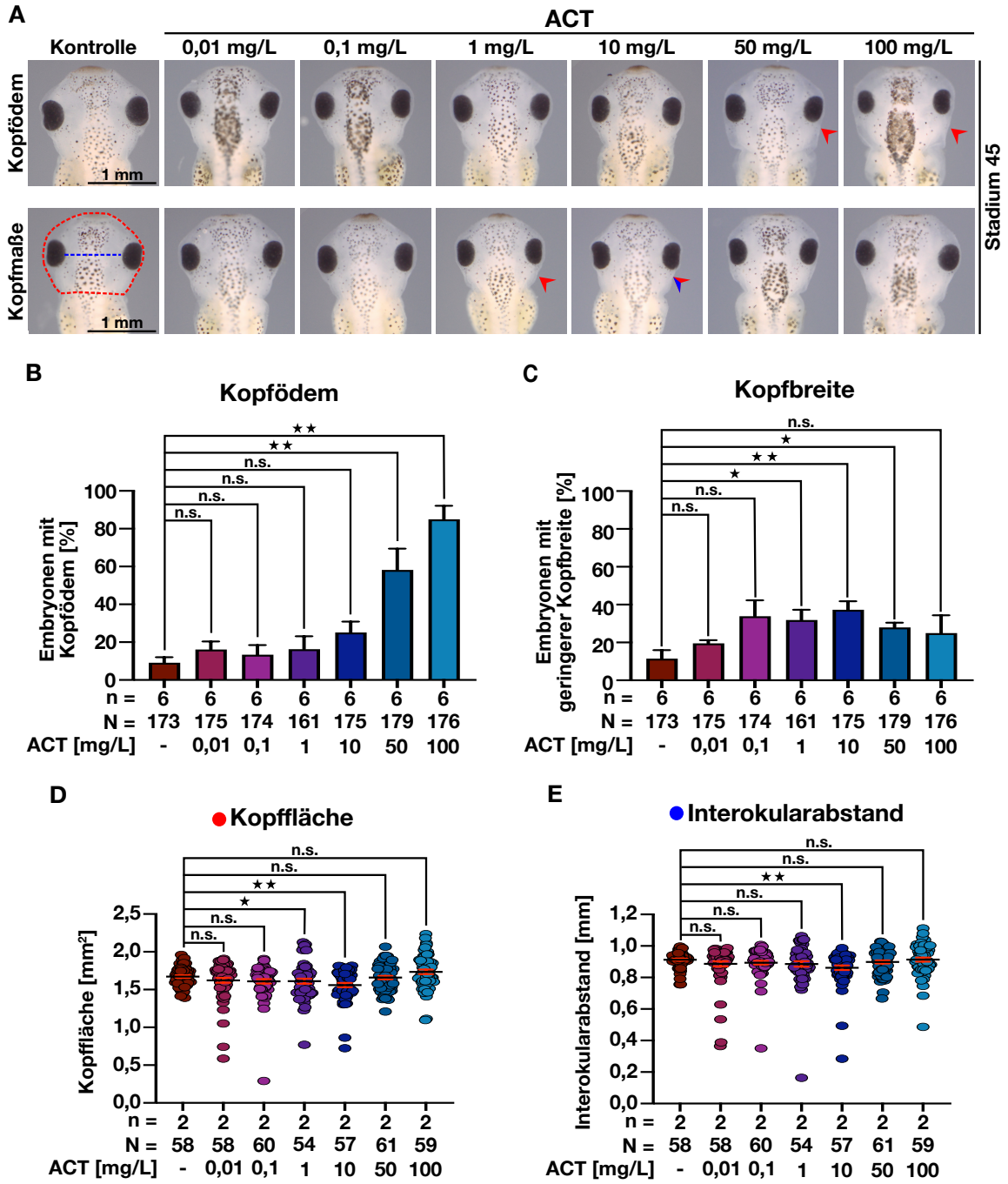

Abb. 16: Auswirkungen von ACT auf die Entwicklung des Kopfes. A: Dorsale Aufnahmen der Köpfe der Embryonen. **B:** Statistische Auswertung von sechs unabhängigen Experimenten nach dem Auftreten von Kopfödemen. Es gibt signifikant mehr Embryonen mit Kopfödemen bei 50 und 100 mg/L ACT im Vergleich zur Kontrolle (rote Pfeile in A, obere Reihe). **C:** Statistische Auswertung der Kopfbreite zeigt signifikant mehr Embryonen mit kleineren Köpfen in den Konzentrationen 1, 10 und 50 mg/L ACT verglichen mit der Kontrolle. **D:** Statistische Darstellung der gemessenen Kopffläche (rote Linie in A, untere Reihe) von zwei unabhängigen Experimenten. Die Kopfflächen der ACT-Konzentrationen 1 und 10 mg/L sind verglichen mit der Kontrolle signifikant kleiner (rote Pfeile in A, untere Reihe). **E:** Die statistische Darstellung des gemessenen Interokularabstandes (blaue Linie in A, untere Reihe) zeigt eine signifikante Verkleinerung bei 10 mg/L ACT (blauer Pfeil in A, untere Reihe). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, **: $p\leq0,01$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.6.2 Einfluss von Acetamiprid auf die Struktur der Kopfknorpel von *X. laevis*

Um die Veränderungen des Kopfes der *X. laevis* Embryonen weiter zu untersuchen, wurden die Kopfknorpel der Embryonen eines Experimentes, bestehend aus Kontrollen und den ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L, mit Alcianblau gefärbt, isoliert und verschiedene Bereiche vermessen. Es wurde die Breite des Knorpels (Abb. 17 B), die Fläche der Branchialbögen (Abb. 17 C) und des *Tectum anterium* (Abb. 17 D) und der Winkel des Meckel Knorpels (Abb. 17 E) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass alle Parameter zunächst bei 0,1 mg/L im Vergleich zur Kontrolle größer wurden, und anschließend ab 10 mg/L (Branchialbogen- und *Tectum anterium*-Fläche), bzw. 100 mg/L (Knorpelbreite und Winkel des Meckel Knorpels) signifikant abnahmen.

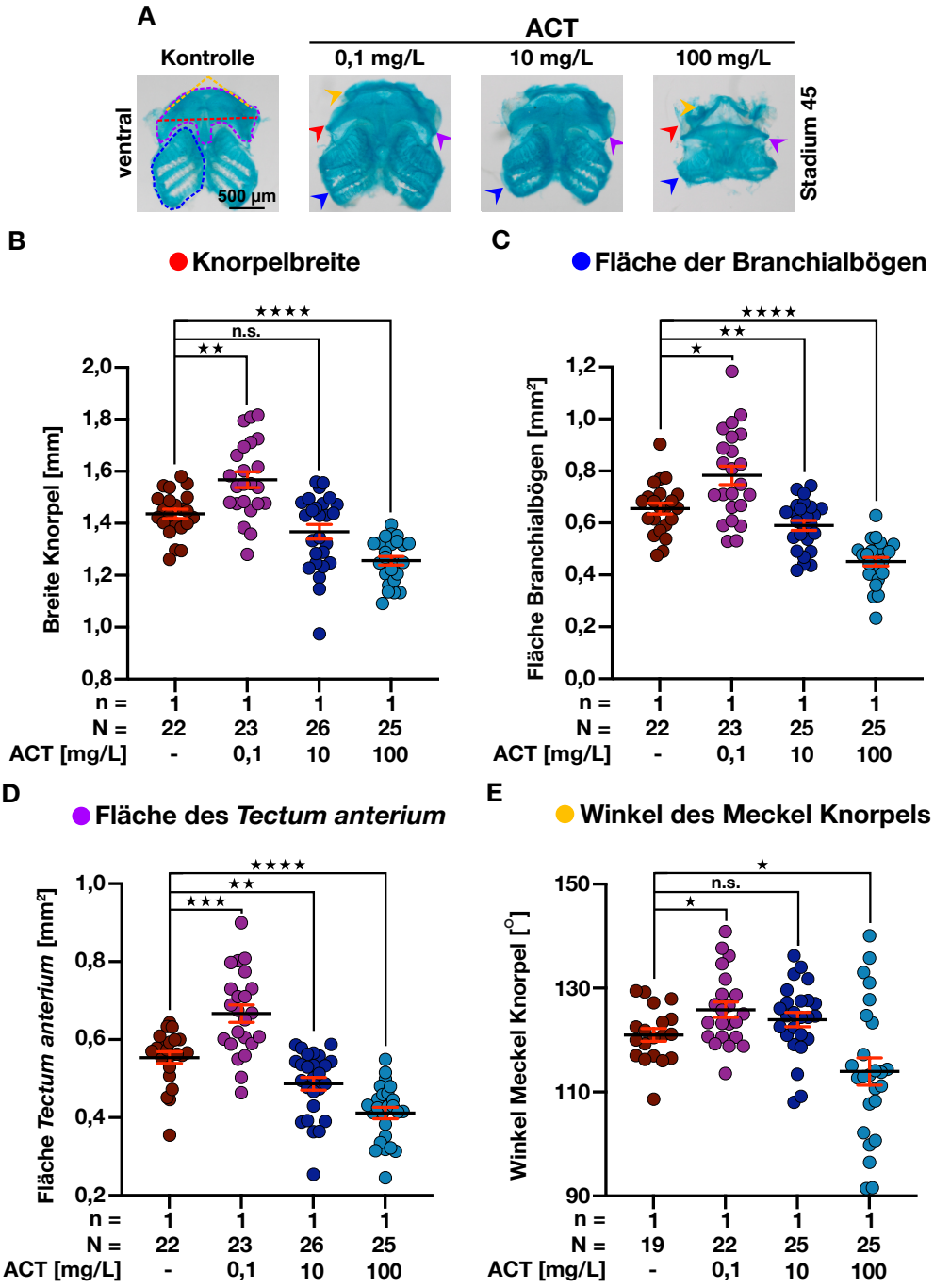

Abb. 17: Analyse der Auswirkungen von ACT auf den Kopfknorpel. A: Fotos der Kopfknorpel von ventral. **B:** Statistische Darstellung der gemessenen Knorpelbreite eines Experimentes (rote Linie in A). Die Knorpel der mit 0,1 mg/L ACT behandelten Embryonen sind signifikant breiter, die von 100 mg/L signifikant schmäler (rote Pfeile in A). **C:** Statistik der gemessenen Branchialbogenfläche (blaue Linie in A). Die mit 0,1 mg/L ACT behandelten Embryonen zeigen signifikant größere Branchialbögen, die von 10 und 100 mg/L ACT signifikant kleinere (blaue Pfeile in A). **D:** Messung der Fläche des *Tectum anterium* (lila Linie in A). Die *Tectum anterium*-Flächen der ACT-Konzentration 0,1 mg/L ist signifikant größer, die von 10 und 100 mg/L sind verglichen mit der Kontrolle signifikant kleiner (lila Pfeile in A). **E:** Bestimmung des Meckel Knorpel Winkels (orange Linie in A). Es zeigt sich eine signifikante Vergrößerung bei 0,1 mg/L und eine Verkleinerung bei 100 mg/L (orangene Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, **: $p\leq0,01$, ***: $p\leq0,001$, ****: $p\leq0,0001$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.6.3 Effekt von Acetamiprid auf die Morphologie der Hirnnerven von *X. laevis*

Die Ausbildung von Nerven ist essentiell für die korrekte Funktion der inneren Organe und der Sinneswahrnehmung. Um den Einfluss von ACT auf die Hirnnervenentwicklung bei *X. laevis* Embryonen zu untersuchen, wurde eine 3A10-Antikörperfärbung bei den Embryonen dreier Experimente mit den Kontrollen und den ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L durchgeführt und fünf verschiedene Nerven vermessen. Die Knorpelfläche der Embryonen wurde ebenfalls vermessen, um die Länge der Nerven mit der Größe des Kopfes vergleichen zu können.

Von dorsal wurden drei verschiedene Nerven in ihrer 2D-Darstellung vermessen (Abb. 18). Bei der Messung des *N. trigeminus* zeigte sich eine signifikante Verkürzung ab 10 mg/L ACT (Abb. 18 B). Betrachtet man die Nervenlänge im Verhältnis zur Knorpelfläche zeigte sich keine signifikante Veränderung (Abb. 18 C). Der *N. opticus* zeigte ebenfalls eine signifikante Längenreduktion ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L ACT (Abb. 18 D). Bei der Betrachtung des Verhältnisses zwischen Nervenlänge und Knorpelfläche zeigte sich in 10 mg/L eine signifikante Verkleinerung (Abb. 18 E). Die Messung des *N. glossopharyngeus* ergab eine signifikante Verkürzung des Nervs in den ACT-Konzentrationen 10 und 100 mg/L (Abb. 18 F). Das Verhältnis zur Knorpelfläche zeigte bei 10 mg/L ACT eine signifikante Reduktion (Abb. 18 G).

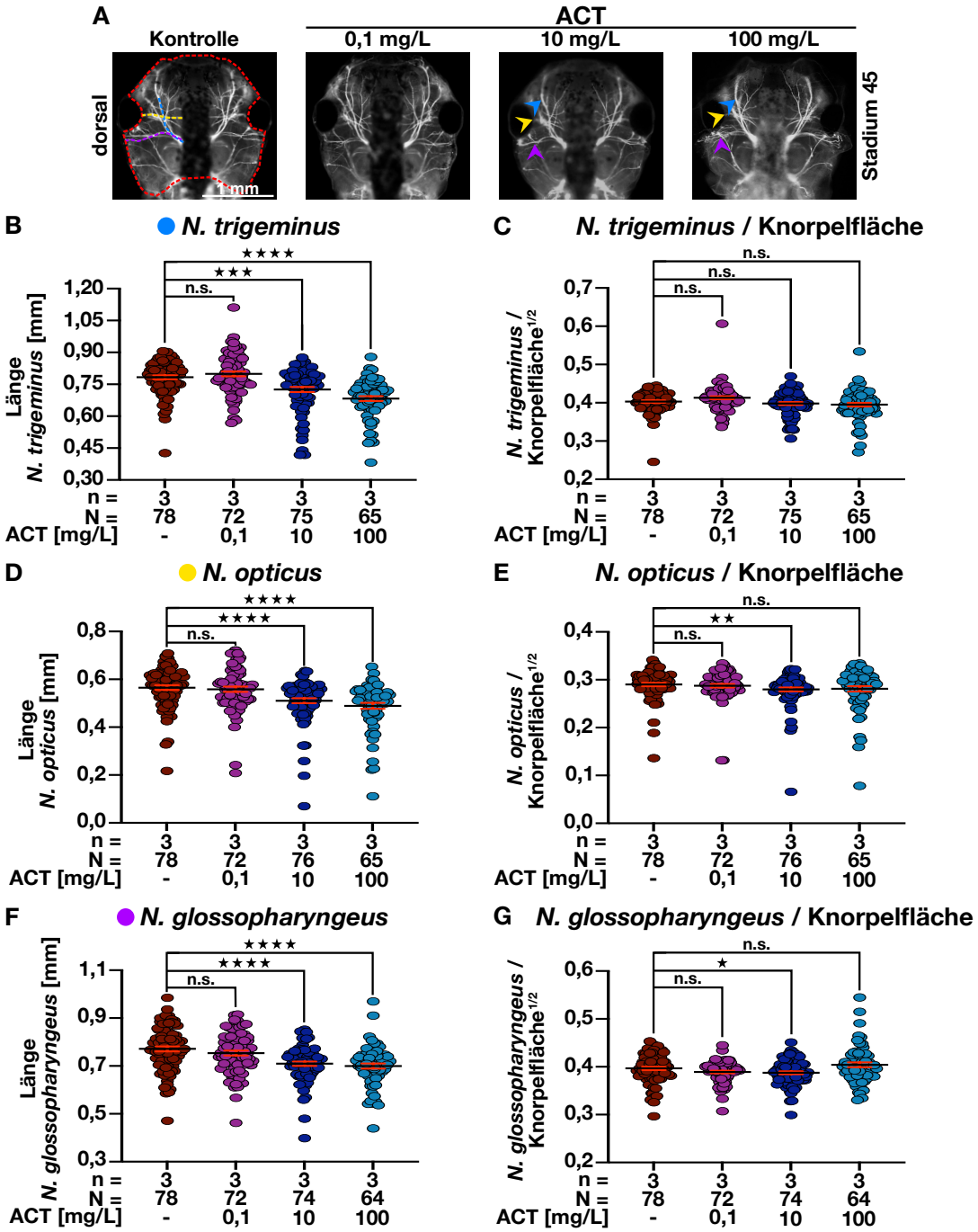

Abb. 18: Analyse der Auswirkungen von ACT auf die dorsalen Hirnnerven. A: Fotos der Hirnnerven von dorsal. **B:** Ausmessung der Länge des *N. trigeminus* in mm (blaue Linie in A). Ab 10 mg/L ACT ist der Nerv signifikant kürzer, als in der Kontrolle (blaue Pfeile in A). **C:** Statistische Darstellung der *N. trigeminus*-Länge im Verhältnis zur Knorpelfläche (rote Linie in A). Es zeigt sich keine signifikante Veränderung. **D:** Statistik der Längenmessung des *N. opticus* in mm (gelbe Linie in A). Ab 10 mg/L ACT kann eine signifikante Verkürzung beobachtet werden (gelbe Pfeile in A). **E:** Statistik der Länge des *N. opticus* im Verhältnis zur Knorpelfläche (rote Linie in A). 10 mg/L ACT zeigt eine signifikante Veränderung. **F:** Statistische Darstellung der gemessenen *N. glossopharyngeus*-Länge (lila Linie in A). Signifikante Verkürzung ab 10 mg/L ACT (lila Pfeile in A). **G:** Darstellung des Verhältnisses der Länge des *N. glossopharyngeus* zur Knorpelfläche (rote Linie in A). 10 mg/L ACT ist signifikant verändert. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05, *: p≤0,05, **: p≤0,01, ***: p≤0,001, ****: p≤0,0001

Von ventral wurden zwei Nerven näher betrachtet (Abb. 19). Der *N. hypoglossus* zeigte eine signifikante Längenreduktion in den mit 10 und 100 mg/L ACT behandelten Konzentrationen (Abb. 19 B). Das Verhältnis der Nervenlänge zur Knorpelfläche war bei den mit 10 und 100 mg/L ACT behandelten Embryonen signifikant verändert (Abb. 19 C).

Die Messung des ventralen Verlaufs des *N. glossopharyngeus* zeigte nach Vergleich mit der Kontrolle ebenso eine signifikante Längenreduktion nach 10 und 100 mg/L ACT Behandlung (Abb. 19 D). Die Berechnung des Verhältnisses der Nervenlänge zur Knorpelfläche zeigte eine signifikante Veränderung bei den mit 0,1 und 100 mg/L ACT behandelten Embryonen (Abb. 19 E).

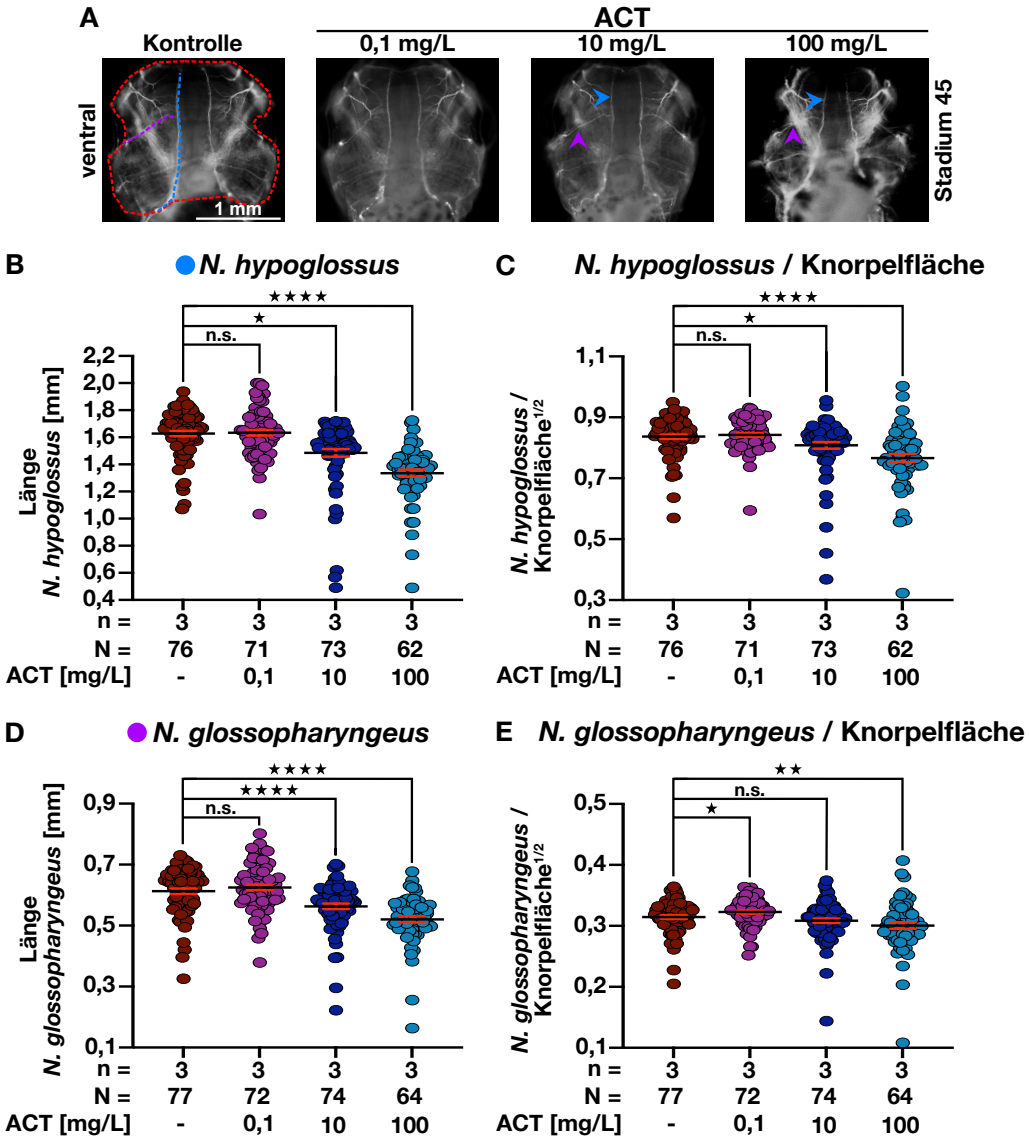

Abb. 19: Analyse der Auswirkungen von ACT auf die ventralen Hirnnerven. A: Fotos der Hirnnerven von ventral. **B:** Längenmessung des *N. hypoglossus* in mm (blaue Linie in A). Der Nerv zeigt ab 10 mg/L ACT eine signifikante Verkürzung (blaue Pfeile in A). **C:** Statistik der Länge des *N. hypoglossus* im Verhältnis zur Knorpelfläche (rote Linie in A). Es zeigte sich eine signifikante Verkürzung in 10 und 100 mg/L ACT. **D:** Statistische Darstellung der Längenmessung des *N. glossopharyngeus* von ventral in mm (lila Linie in A). Ab 10 mg/L ACT zeigt sich eine signifikante Verkürzung (lila Pfeile in A). **E:** Statistik der Länge des *N. glossopharyngeus* im Verhältnis zur Knorpelfläche (rote Linie in A). 0,1 mg/L ACT ist signifikant höher als die Kontrolle, 100 mg/L ACT signifikant kleiner. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, **: $p\leq0,01$, ****: $p\leq0,0001$

Exemplarisch wurden 3D-Aufnahmen der Nerven von Kontrollembryonen und 100 mg/L ACT inkubierten Embryonen angefertigt, um zusätzlich zur Länge die Struktur, also die Beschaffenheit, der Nerven darstellen zu können. Hierbei zeigte

sich, dass die Nerven der mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen deutlich aufgefaserter und weniger zielgerichtet erscheinen als die der Kontrollen (Abb. 20).

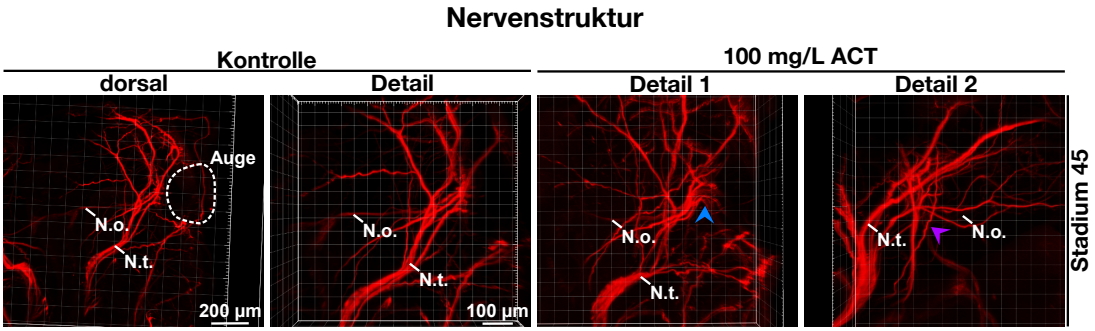

Abb. 20: Darstellung der Nervenstruktur in 3D. Aufgenommen wurden exemplarisch Embryonen der Kontrolle und von 100 mg/L ACT. Im ersten Bild von links ist die Übersichtsaufnahme eines Kontrollembryos von dorsal zu sehen. Im zweiten Bild sieht man die Nerven des Kontrollembryos im Detail. Die zwei rechten Bilder zeigen die Detailaufnahmen der Nerven zweier mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen. Die Nerven zeigen sich deutlich aufgefaserter (blauer Pfeil in Detail 1) und weniger zielgerichtet (lila Pfeil in Detail 2) als die Nerven der Kontrollembryonen. **Abkürzungen:** ACT = Acetamiprid, N.o. = N. opticus, N.t. = N. trigeminus

3.1.6.4 Veränderungen in der Markergenexpression der Neuralleistenzellen nach Inkubation mit Acetamiprid

Um zu analysieren, welche molekulare Basis die Veränderungen der Neuralleistenabkömmlinge haben, wurde eine Whole mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) mit Markern der Neuralleistenzellen (*egr2* und *twist*) durchgeführt. Die Analyse zweier unabhängiger Experimente zeigte eine Tendenz einer höheren Anzahl an Embryonen mit veränderter *egr2* Expression mit aufsteigender ACT-Konzentration (Abb. 21 B). Die Expression von *twist* war bei Kontrollembryonen und ACT behandelten Embryonen unverändert (Abb. 21 B).

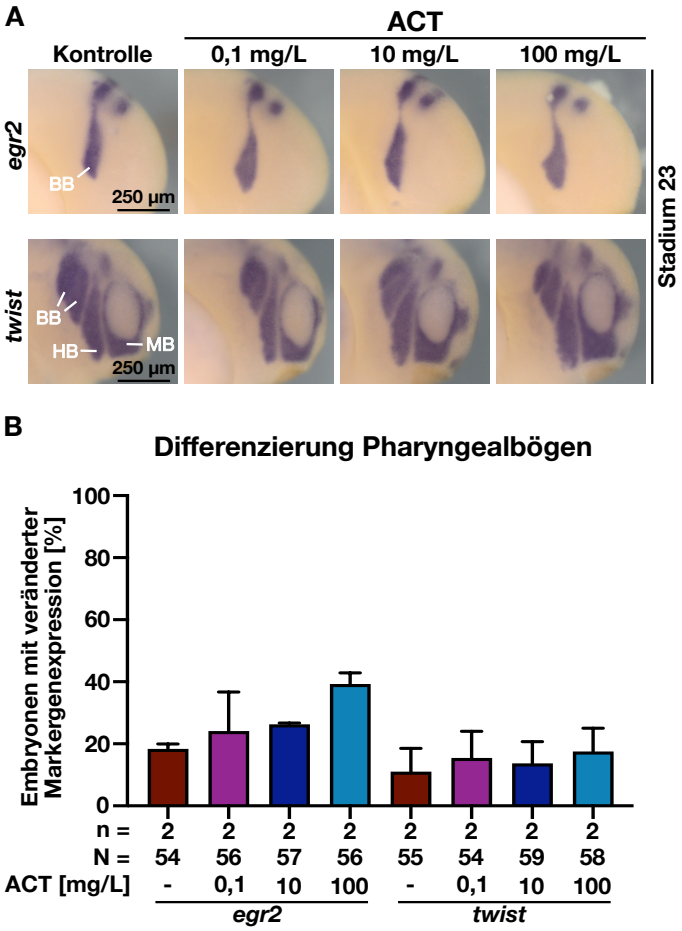

Abb. 21: Analyse der Markergenexpression der Neuralleistenzellen im Stadium 23. A: Von lateral fotografierte Embryonen mit der Expression von *egr2* (obere Reihe) und *twist* (untere Reihe). **B:** Lichtmikroskopisch analysierte Veränderungen in der Markergenexpression der Kontrollen und der mit 0,1, 10 und 100 mg/L ACT behandelten Embryonen von zwei unabhängigen Experimenten. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, ACT = Acetamiprid, BB = Branchialbogen, HB = Hyoidalbogen, MB = Mandibularbogen (modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.6.5 Größenveränderungen des Gehirns von *X. laevis* durch Acetamiprid

Zur detaillierten Analyse des Kopfbereiches der Embryonen wurde auch das Gehirn näher untersucht. Hierfür wurde das Gehirn der Embryonen der Kontrollen und der ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L zweier unabhängiger Experimente isoliert und die Fläche vermessen (Abb. 22). Hierbei zeigte sich, dass die Gehirne der mit 10 mg/L ACT behandelten Embryonen im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkleinert sind.

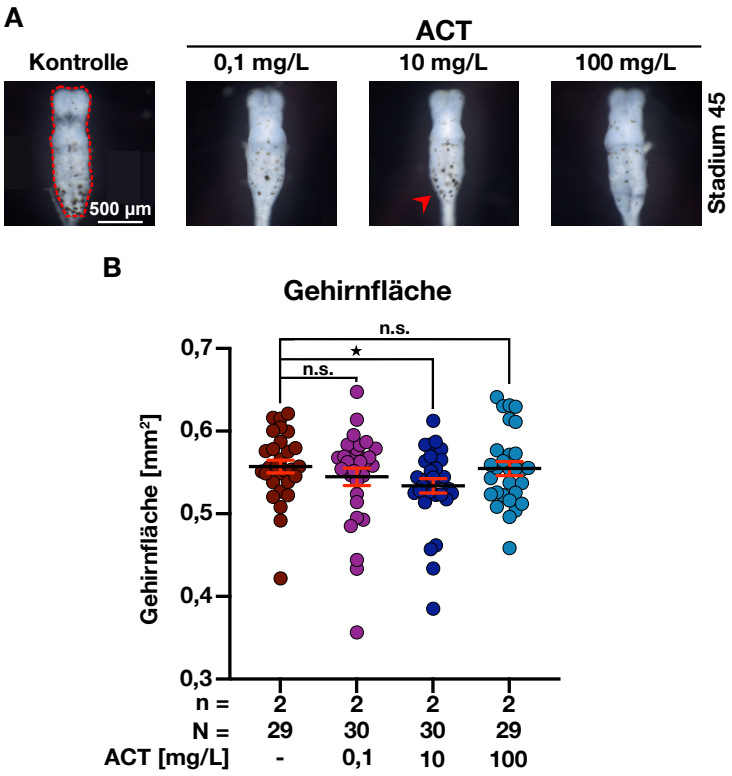

Abb. 22: Auswirkungen von ACT auf die Fläche des Gehirns. A: Fotos der isolierten Gehirne von dorsal. **B:** Statistische Darstellung der gemessenen Hirnfläche in mm^2 (rote Linie in A) der Kontrollen und der ACT-Konzentrationen (0,1, 10 und 100 mg/L) von zwei unabhängigen Experimenten. Die Hirnfläche der mit 10 mg/L ACT inkubierten Embryonen ist signifikant kleiner, als die der Kontrollen (roter Pfeil in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$

3.1.7 Einfluss von Acetamiprid auf die Herzen von *X. laevis*

3.1.7.1 Effekt von Acetamiprid auf Struktur und Funktion des Herzens von *X. laevis*

Das Herz stellt eines der wichtigsten Organe jedes Tieres dar. Ohne ein funktionierendes Herz kann kein Blutfluss, und somit auch keine Nährstoffversorgung der Körperzellen gewährleistet werden. Um die Funktion des Herzens der *X. laevis* Embryonen nach Inkubation mit ACT zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewandt.

Zunächst wurden die Herzen lichtmikroskopisch auf Herzödeme untersucht. Hierbei zeigten sich bei den Embryonen, die einer Konzentration von 100 mg/L ACT ausgesetzt waren, signifikant mehr Herzödeme als in der Kontrolle. Bereits bei den mit 50 mg/L ACT behandelten Embryonen zeigte sich eine tendenziell erhöhte Anzahl an Herzödemen (Abb. 23 B).

Anschließend wurde bei drei unabhängigen Experimenten eine Herzfrequenzmessung durchgeführt. Diese ergab eine signifikant höhere Herzfrequenz bei den in 100 mg/L ACT inkubierten Embryonen (Abb. 23 C).

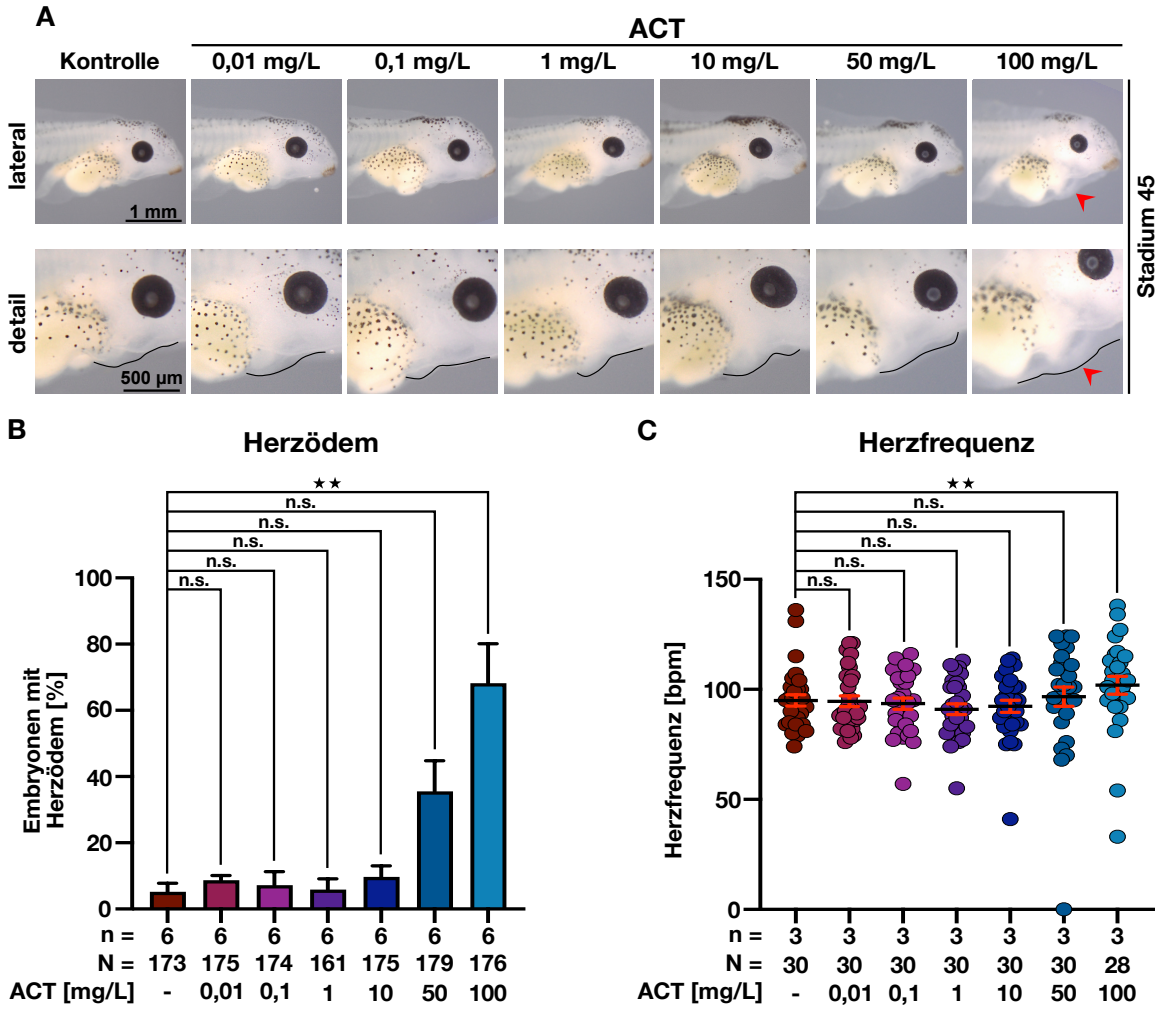

Abb. 23: Analyse der Auswirkungen von ACT auf die Herzen. A: Von lateral aufgenommene Embryonen mit Fokus auf die Herzregion. Obere Reihe: Übersichtsaufnahme; untere Reihe: Detailaufnahme mit Umrandung des Herzödems (schwarze Linie). **B:** Prozentualer Anteil der Embryonen mit Herzödemen. Die mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen zeigen signifkant mehr Herzödeme als die Kontrollen (rote Pfeile in A). **C:** Statistik der Messung der Herzfrequenz. Signifikant höhere Herzfrequenz bei 100 mg/L ACT. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, **: $p\leq0,01$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Um einer eventuellen Ursache der erhöhten Herzfrequenz und möglichen Auswirkungen des Herzödems auf den Grund gehen zu können, wurden aus Embryonen von zwei unabhängigen Experimenten, bestehend aus den Kontrollen und den ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L, die Herzen isoliert. Diese Herzen wurden nach normalem Aussehen und makroskopisch sichtbarem Phänotyp analysiert.

Außerdem wurde eine Tnnt2-Antikörperfärbung weiterer zwei Experimente derselben Konzentrationen durchgeführt. Auch diese Herzen wurden makroskopisch auf Phänotypen untersucht (Abb. 24 A). Aus beiden Auswertungen ergab sich kombiniert die Statistik zur Anzahl der Embryonen mit abnormalem Herzen (Abb. 24 B). Hier zeigte sich ab 10 mg/L ACT eine signifikant höhere Anzahl an Phänotypen als in den Kontrollen. Bereits bei 0,1 mg/L war eine steigende Tendenz zu sehen.

Abschließend wurden exemplarisch repräsentative Herzen jeder Konzentration durch ein Konfokalmikroskop dreidimensional dargestellt (Abb. 24 C). Hierbei zeigte sich, dass sich nicht nur die Form der Herzen stark verändert, sondern auch die Wanddicke abnimmt und die Wandstruktur weniger gerichtet und geordnet ist.

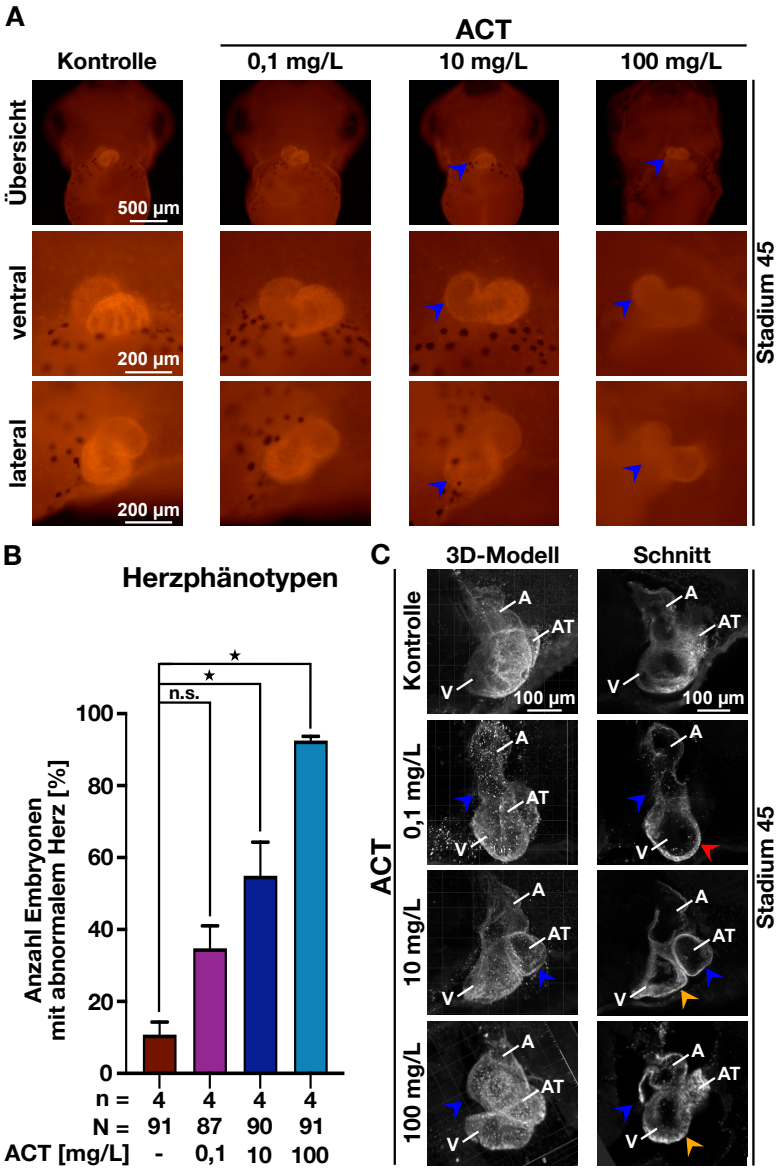

Abb. 24: Strukturelle Veränderungen der Herzen nach Inkubation mit ACT. A: Bilder der Tnnt2-gefärbten Embryonen. Obere Reihe: Übersicht von ventral über die Lage des Herzens im Embryo. Mittlere Reihe: Detailaufnahme von ventral. Untere Reihe: Detailaufnahme von lateral. **B:** Prozentualer Anteil der Herzphänotypen jeder ACT-Konzentration (0,1, 10 und 100 mg/L) und der Kontrollen. Ab 10 mg/L ACT weisen die Embryonen einen signifikant erhöhten Anteil an Herzphänotypen als die Kontrollen auf. **C:** 3D-Aufnahmen exemplarischer Herzen. Die linke Reihe zeigt das 3D-Modell, die rechte einen Schnitt durch die 3D-Aufnahme. Es zeigen sich in allen Konzentrationen Formveränderungen (blauer Pfeil), 0,1 mg/L ACT zeigt eine verdünnte Herzwand (roter Pfeil), während die Herzwand von 10 und 100 mg/L ACT eine veränderte Struktur aufweist (gelbe Pfeile). **Abkürzungen:** A = Atrium, AT = Ausflusstrakt, V = Ventrikel, n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.1.7.2 Veränderungen in der Markergenexpression der Herzen von *X. laevis* nach Inkubation mit Acetamiprid

Um den molekularen Grundlagen für die Veränderungen der Herzen auf den Grund zu gehen, wurde eine Whole mount *in situ* Hybridisierung mit Herzmuskel-spezifischen Markern (*actc1* und *mhca*) im Stadium 28 durchgeführt.

Es wurden lichtmikroskopisch die Expressionen der Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L ACT zweier Experimente mit einem repräsentativen Embryo aus der Kontrolle verglichen, und so abnormale Expressionsmuster erfasst (Abb. 25 A). Es zeigte sich vor allem bei *mhca* tendenziell ein höherer Anteil an Embryonen mit veränderter Expression in den ACT-Konzentrationen 10 und 100 mg/L (Abb. 25 B). Die *actc1*-Expression war dagegen unverändert.

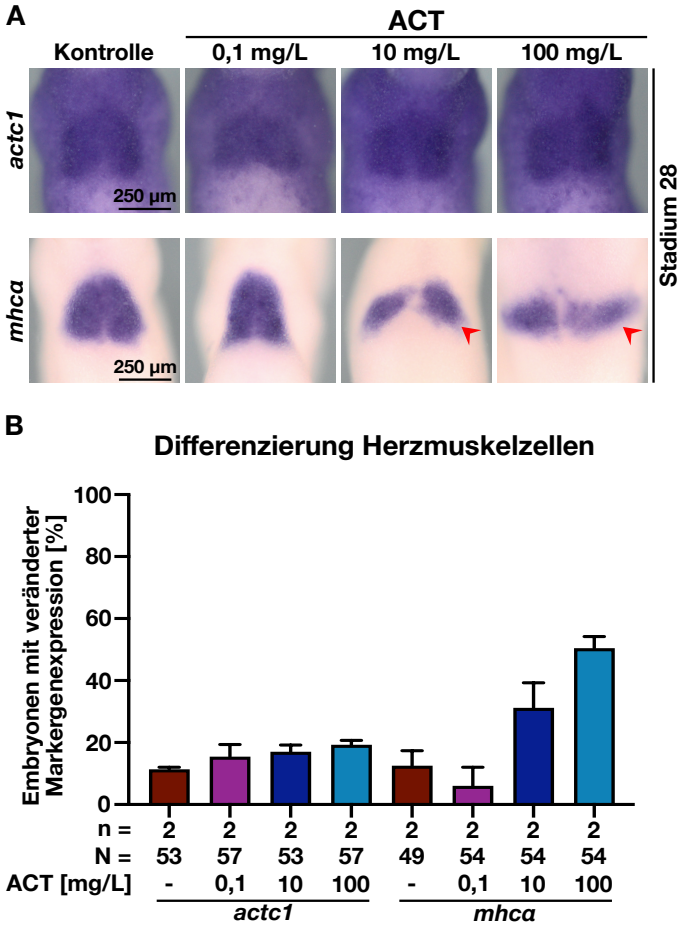

Abb. 25: Expression der Herzmarker *actc1* und *mhca* unter ACT-Einfluss. A: Obere Reihe: Embryonen der Kontrollen und der ACT-Konzentrationen 0,1, 10 und 100 mg/L nach Färbung von *actc1*. Untere Reihe: Repräsentative Fotos von *mhca*-gefärbten Embryonen. **B:** Statistische Auswertung der Embryonen mit veränderter Markergenexpression. Tendenziell zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Embryonen mit veränderter *mhca*-Expression ab 10 mg/L ACT (rote Pfeile in A). Die *actc1*-gefärbten Embryonen zeigen keine deutliche Veränderung. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, ACT = Acetamiprid.
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Um das Ergebnis der *mhca*-Expression zu quantifizieren, wurde die Fläche (Abb. 26 B) und Intensität (Abb. 26 C) der Expression eines Experiments vermessen und statistisch dargestellt. Die Fläche zeigte bei den mit 100 mg/L ACT inkubierten Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Vergrößerung. Die Intensität dagegen nahm bereits ab 10 mg/L ACT signifikant ab.

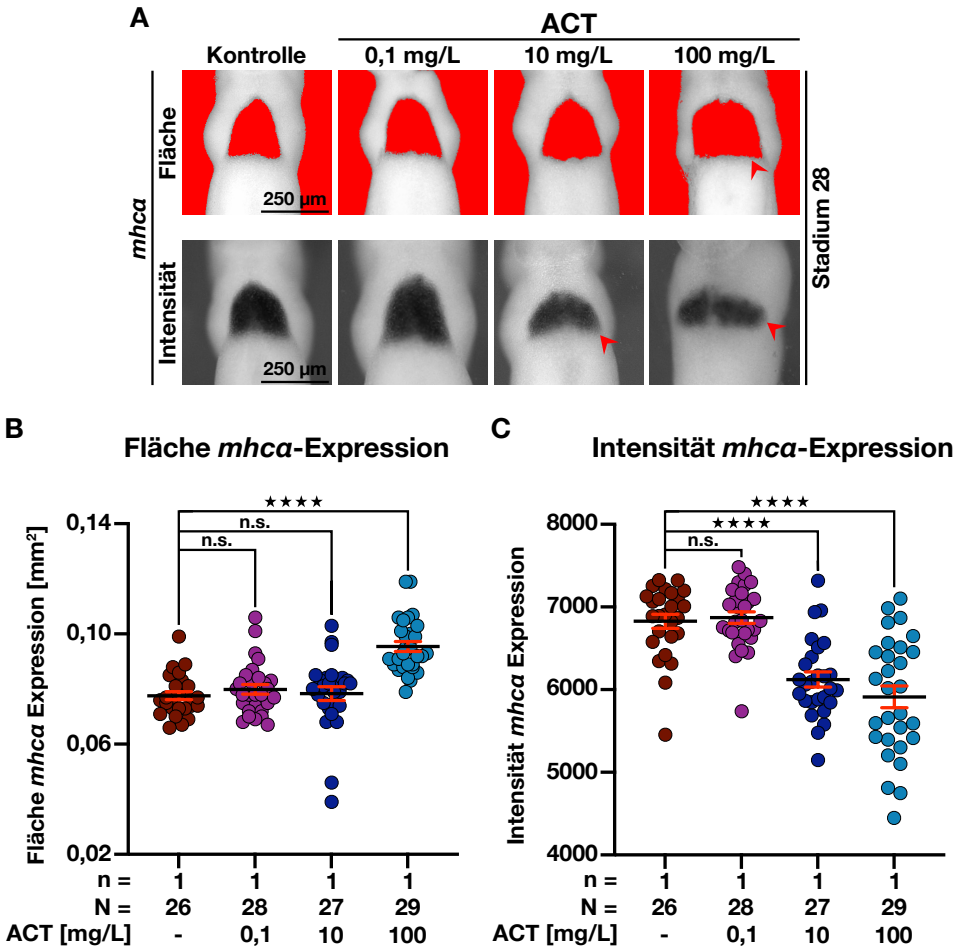

Abb. 26: Quantitative Analyse der *mhca*-Expression. A: Dargestellt ist die vermessene Fläche der *mhca*-Expression mit Hilfe des Programms Fiji/ImageJ (obere Reihe) und die Intensität von *mhca* (untere Reihe) in den verschiedenen Konzentrationen. **B:** Statistische Darstellung der gemessenen Expressionsfläche. Eine signifikante Vergrößerung ist nach 100 mg/L ACT Inkubation zu sehen (roter Pfeil in A, obere Reihe). **C:** Die Intensität der *mhca*-Expression ist signifikant geringer ab 10 mg/L ACT (rote Pfeile in A, untere Reihe). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, ****: $p\leq0,0001$
(modifiziert nach [26], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

3.2 Ergebnisse zum Acetamiprid-haltigen Insektizid Danjiri

3.2.1 Effekt von Danjiri auf die Mortalität der *X. laevis* Embryonen

Um die Toxizität des landwirtschaftlich zugelassenen, ACT-haltigen Insektizides Danjiri (DAN) für *X. laevis* festzustellen, wurden Embryonen in einer 0,1x MBSH-Kontrolle und in Danjiri-haltigen Lösungen inkubiert. Diese wurden so verdünnt, dass sie 0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L ACT enthielten. Hierbei zeigte sich, dass die DAN-Lösung, die 100 mg/L ACT enthielt, für alle Embryonen letal wirkte (Abb. 27).

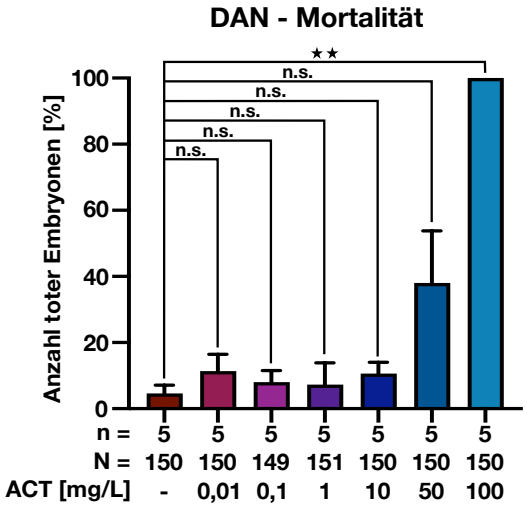

Abb. 27: Mortalität der Embryonen nach DAN-Inkubation. Dargestellt ist die Sterblichkeitsrate der Embryonen nach Inkubation mit verschiedenen ACT-Konzentrationen in DAN. In 100 mg/L ACT in DAN inkubierte Embryonen zeigen eine signifikante Mortalität mit 100 % Sterberate. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, **: $p\leq0,01$

3.2.2 Veränderungen der Körperlänge von *X. laevis* nach Inkubation mit Danjiri

Auch nach der Behandlung mit DAN wurden die Embryonen der Kontrollen und der DAN-Lösungen (0,01, 0,1, 1, 10 und 50 mg/L ACT, da 100 mg/L tödlich wirkte) einer makroskopischen Analyse unterzogen. Hierfür wurde zunächst die Körperlänge der Embryonen in Stadium 45 nach Kontakt mit DAN untersucht.

Die lichtmikroskopische Auswertung (Abb. 28 B) ergab eine signifikante Längenreduktion in den Konzentrationen 0,1 und 10 mg/L ACT in DAN. In der quantitativen Analyse der Körperlänge (Abb. 28 C) ergaben sich signifikant verlängerte Körper bei einer ACT-Konzentration von 10 mg/L, während die in

50 mg/L ACT in DAN inkubierten Embryonen signifikant reduzierte Körperlängen zeigten.

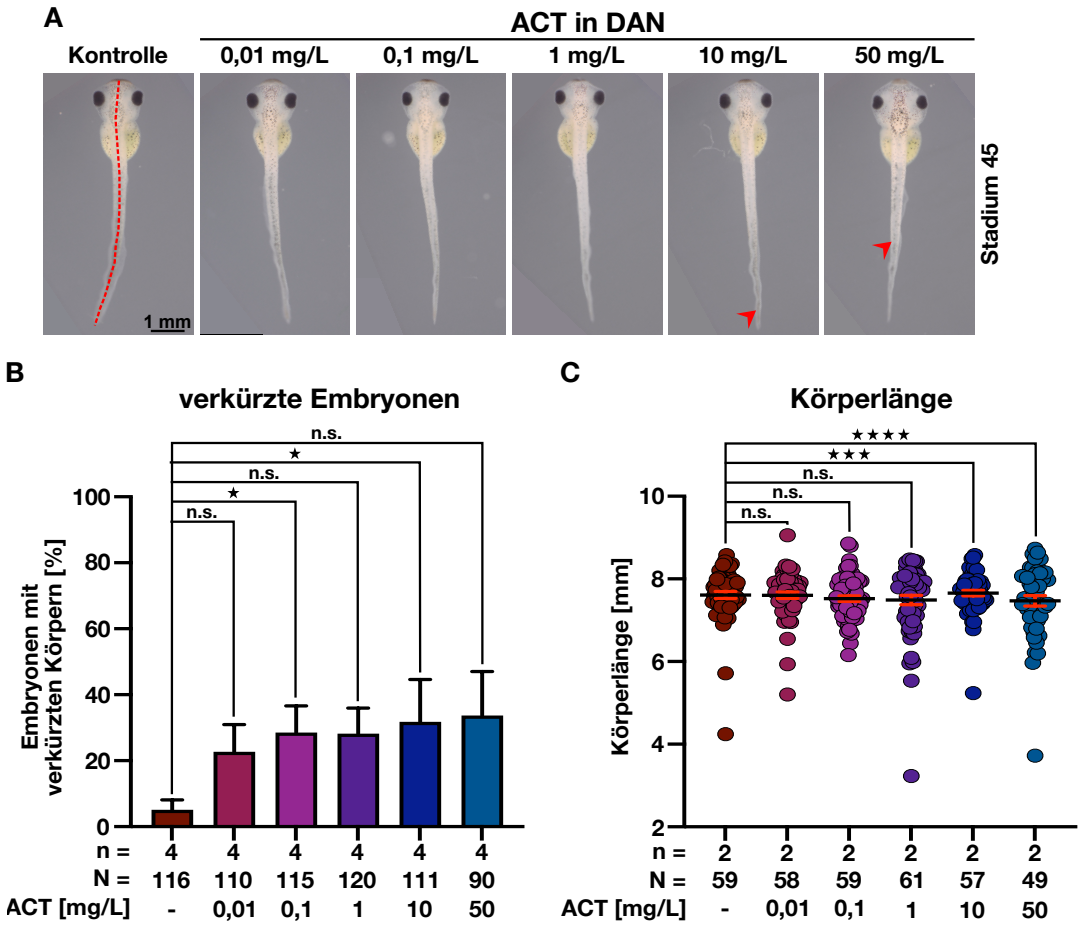

Abb. 28: Auswirkungen von DAN auf die Körperlänge von *X. laevis*. A: Fotos dorsal aufgenommener Embryonen im Stadium 45. **B:** Lichtmikroskopisch untersuchte Embryonen aus vier unabhängigen Experimenten in Bezug auf die Körperlänge. Die Konzentrationen 0,1 und 10 mg/L ACT zeigen signifikant mehr Embryonen mit verkürzten Schwänzen. **C:** Statistik der gemessenen Körperlängen (rote Linie in A). Embryonen der ACT-Konzentration 10 mg/L sind signifikant länger als die Kontrollen, während 50 mg/L sich signifikant kürzer zeigt (Rote Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, ***: $p\leq0,001$, ****: $p\leq0,0001$

3.2.3 Darmmorphologie von *X. laevis* nach Kontakt mit Danjiri

Um auch für DAN die veränderte Organmorphologie beurteilen zu können, wurden die Därme der mit DAN inkubierten Embryonen mit denen der Kontrollen verglichen (Abb. 29 B).

Hier zeigte sich in der Gruppe der 50 mg/L ACT in DAN inkubierten Embryonen eine signifikant höhere Zahl an Darmdeformationen, als in den Kontrollen.

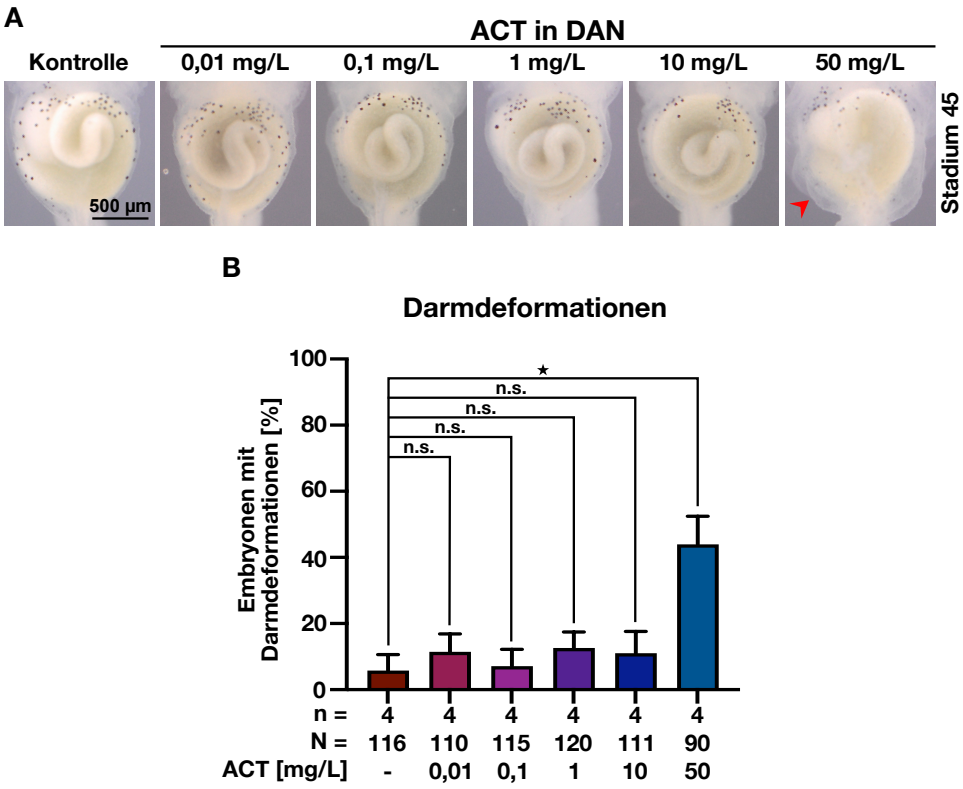

Abb. 29: Darmmorphologie von *X. laevis* nach Inkubation mit DAN. A: Ventral aufgenommene Embryonen im Stadium 45. Die Intestinalregion ist vergrößert dargestellt. **B:** Statistische Auswertung der Anzahl an Embryonen mit deformierten Därmen. Embryonen mit Kontakt zu 50 mg/L ACT in DAN zeigen signifikant mehr Darmdeformationen als die Kontrolle (roter Pfeil in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$

3.2.4 Effekt von Danjiri auf die Augengröße von *X. laevis*

Anschließend wurde die Kopfregion der Embryonen genauer untersucht. Zunächst wurden die Augen nach ihrer Größe beurteilt.

Die Analyse der Augengröße unter dem Lichtmikroskop (Abb. 30 B) ergab signifikant reduzierte Augenflächen ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L.

Anschließend wurden zwei repräsentative Experimente ausgewählt und die Augenflächen der Embryonen ausgemessen (Abb. 30 C). Hierbei ergaben sich bereits ab 0,01 mg/L ACT in DAN signifikant kleiner Augenflächen im Vergleich zu den Kontrollen.

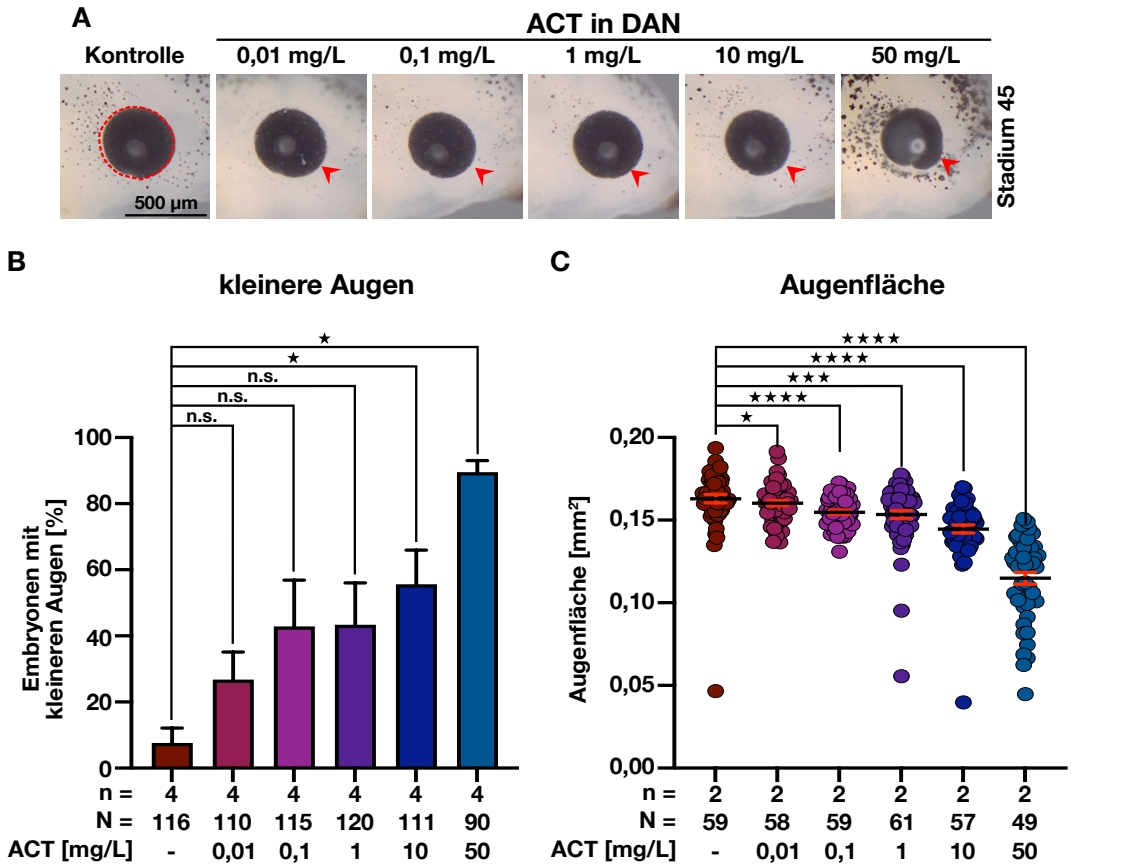

Abb. 30: Analyse der Auswirkungen von DAN auf die Augengröße. A: Fotos lateral liegender Embryonen mit Fokus auf die Augenregion. **B:** Auswertung der Augengröße von vier unabhängigen Experimenten unter dem Lichtmikroskop. Es zeigen sich signifikant kleinere Augen ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L. **C:** Statistik der gemessenen Augenfläche (rote Linie in A). Bereits eine Inkubation mit 0,01 mg/L ACT in DAN führt zu signifikant kleineren Augen (Rote Pfeile in A), wobei die Augenfläche konzentrationsabhängig abnimmt. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05, *: p≤0,05, ***: p≤0,001, ****: p≤0,0001

3.2.5 Auswirkungen von Danjiri auf die Kopfmorphologie von *X. laevis*

Zur ganzheitlichen Betrachtung der Kopfregion der Embryonen, wurde zusätzlich die Kopfmorphologie der Embryonen beurteilt.

Zunächst wurden die Embryonen nach dem Auftreten von Kopfödemen (Abb. 31 B) untersucht. Die Untersuchung von vier unabhängigen Experimenten zeigte signifikant mehr Kopfödeme bei den mit 50 mg/L ACT in DAN behandelten Embryonen, als bei den Kontrollen. Bei Betrachtung der Kopfgröße unter dem Lichtmikroskop (Abb. 31 C) zeigte sich in keiner der untersuchten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Embryonen mit größeren Köpfen, verglichen mit der Kontrolle.

Um die Ergebnisse unter dem Lichtmikroskop zu quantifizieren wurden zwei unabhängige, repräsentative Experimente fotografiert und die Kopffläche, sowie der Interokularabstand vermessen. Die statistische Auswertung der gemessenen Kopfflächen (Abb. 31 D) ergab ab einer ACT-Konzentration von 1 mg/L signifikant vergrößerte Kopfflächen, verglichen mit der Kontrolle. Auch die Ausmessung des Interokularabstandes (Abb. 31 E) zeigte bereits ab 0,1 mg/L ACT eine signifikante Verbreiterung.

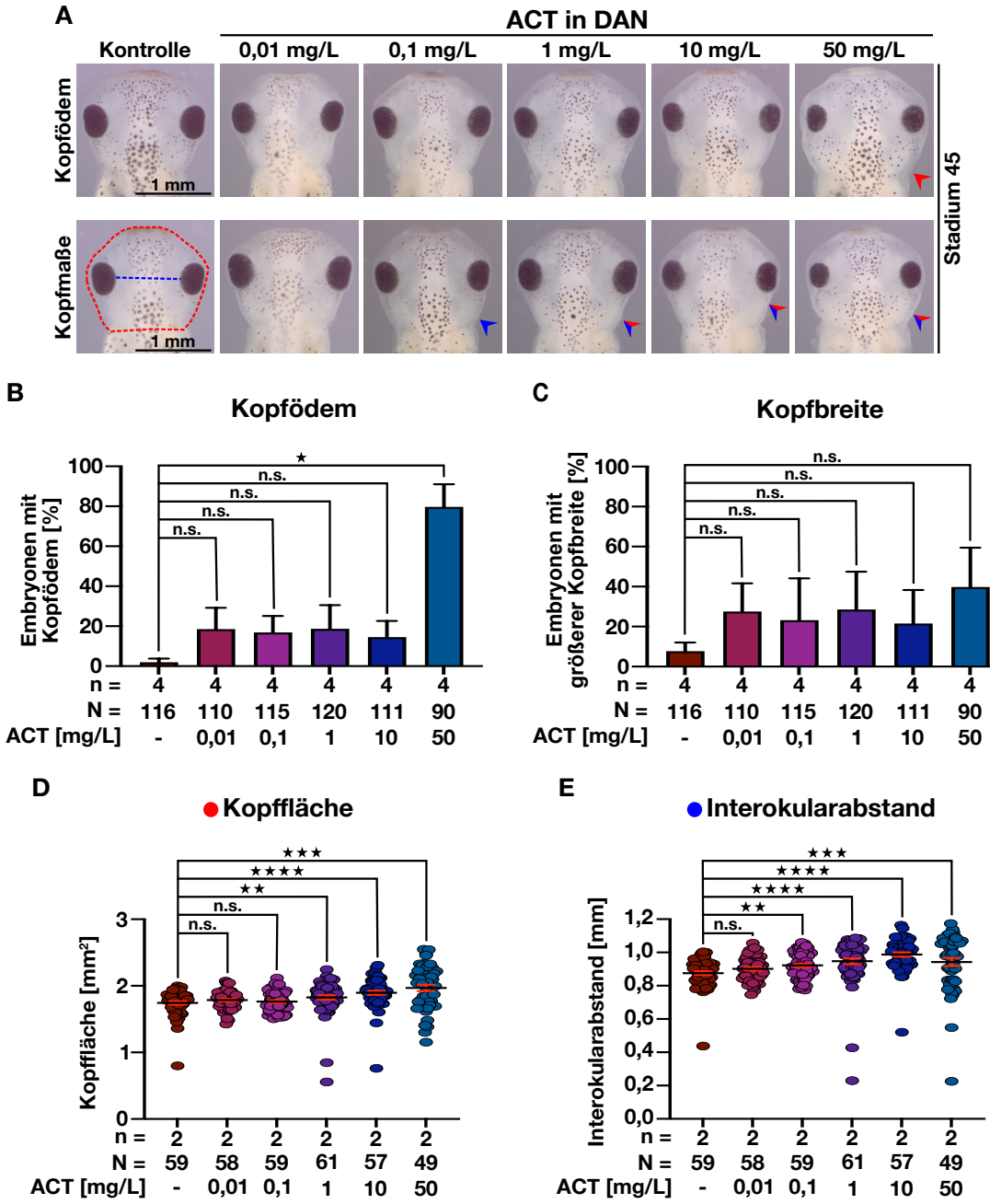

Abb. 31: Veränderungen der Kopfmorphologie nach DAN-Inkubation. A: Obere Reihe: Fotos der Embryonen in Stadium 45 mit Fokus auf sich entwickelnde Kopfödeme. Untere Reihe: Fotos mit Fokus auf den Kopfbereich der Embryonen. **B:** Statistik der Auswertung nach sich entwickelnden Kopfödemen. In 50 mg/L ACT treten signifikant mehr Kopfödeme auf (roter Pfeil in A, obere Reihe). **C:** Auswertung der Embryonen nach größeren Köpfen. Es zeigt sich keine signifikante Steigerung der Kopfbreite. **D:** Messung der Kopffläche der Embryonen (rote Linie in A, untere Reihe). Ab einer ACT-Konzentration in DAN von 1 mg/L sind die Kopfflächen signifikant größer (rote Pfeile in A, untere Reihe). **E:** Statistische Darstellung des gemessenen Interokularabstandes (blaue Linie in A, untere Reihe). Der Interokularabstand ist ab 0,1 mg/L ACT signifikant breiter (blaue Pfeile in A, untere Reihe). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05, *: p≤0,05, **: p≤0,01, ***: p≤0,001, ****: p≤0,0001

3.2.6 Effekt von Danjiri auf Morphologie und Funktion der *X. laevis* Herzen

Wie zuvor bei der Betrachtung des Reinstoffes ACT, wurde bei DAN die makroskopische Veränderung und die Funktion der Herzen der Embryonen ausgewertet.

Bei Betrachtung der Herzregion der Embryonen zeigten sich ab 10 mg/L signifikant mehr Herzödeme (Abb. 32 B) als bei den Kontrollembryonen. Um die Auswirkungen der Veränderung auf die Funktion der Herzen zu untersuchen, wurde eine Herzfrequenzmessung (Abb. 32 C) durchgeführt. Hierbei ergab sich eine signifikant und konzentrationsabhängig erhöhte Herzfrequenz bei den Embryonen, die in 10 und 50 mg/L ACT inkubiert wurden.

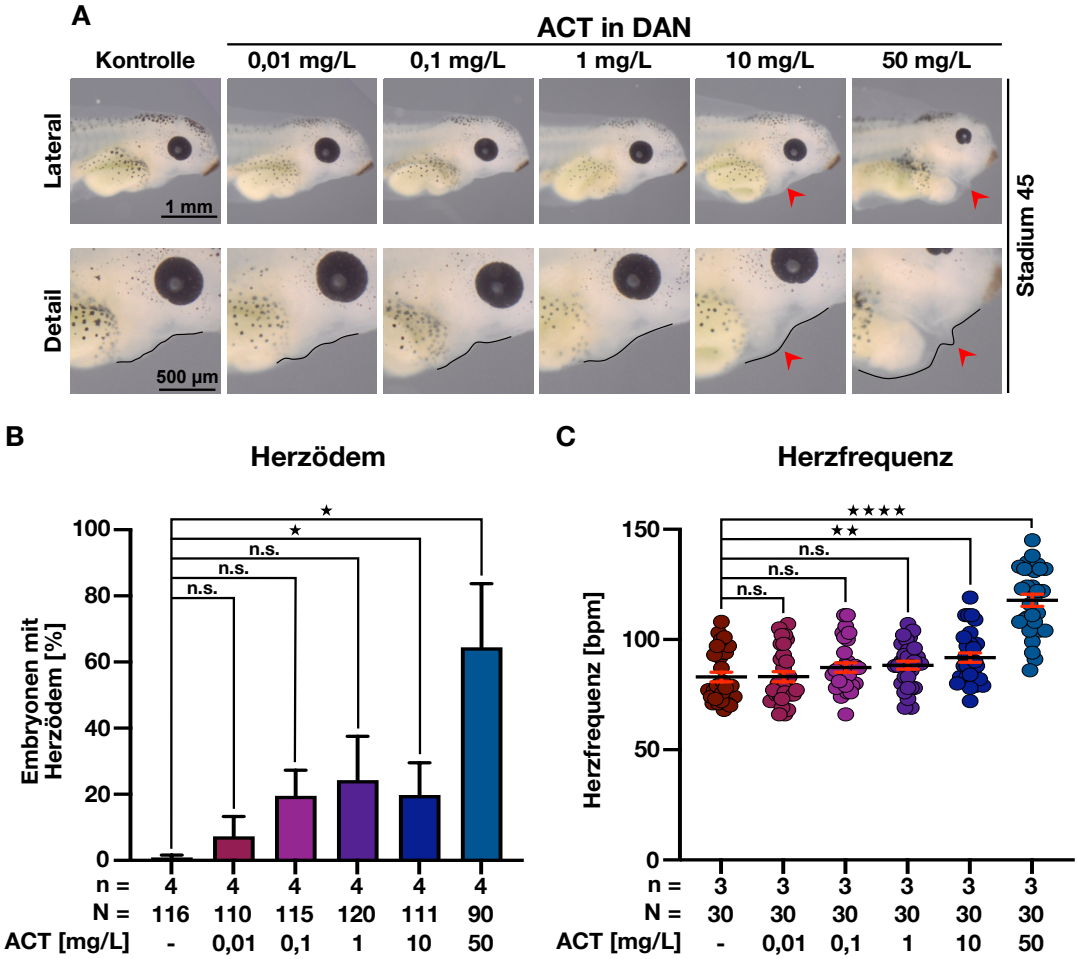

Abb. 32: Veränderungen der Herzen nach DAN-Inkubation. A: Dargestellt ist die Herzregion der Embryonen. Obere Reihe: Übersichtsaufnahme. Untere Reihe: Detailansicht der Herzregion. **B:** Statistik der Herzödeme bei DAN-inkubierten Embryonen. Ab 10 mg/L ACT zeigen sich signifikant mehr Herzödeme (rote Pfeile in A). **C:** Darstellung der Herzfrequenz der Kontrollen und der ACT in DAN-inkubierten Embryonen. Ab 10 mg/L ACT ist die Herzfrequenz signifikant und konzentrationsabhängig erhöht. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, DAN = Danjiri. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, **: $p\leq0,01$, ****: $p\leq0,0001$

3.3 Ergebnisse zu dem Acetamiprid-haltigen Insektizid Careo zum Gießen

3.3.1 Mortalitätsanalyse der *X. laevis* Embryonen nach Inkubation mit Careo zum Gießen

Es wurden *X. laevis*-Embryonen in verschiedenen Careo zum Gießen (CRG) Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert, und ihr Überleben analysiert (Abb. 33).

Es zeigte sich eine signifikante Sterblichkeit der Embryonen in den ACT-Konzentrationen ab 50 mg/L, wobei die in 100 mg/L ACT in CRG inkubierten Embryonen alle starben.

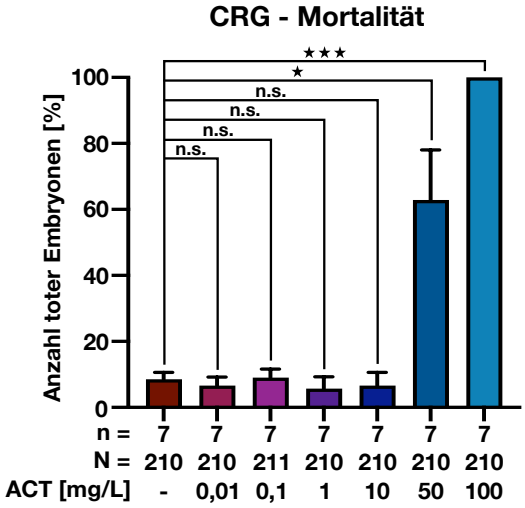

Abb. 33: Sterblichkeitsrate von *X. laevis* nach Inkubation in CRG. Die Statistik zeigt die Anzahl der verstorbenen Embryonen der Kontrollen und der CRG behandelten Gruppen. Ab 50 mg/L ACT sterben signifikant mehr Embryonen als in den Kontrollen, wobei 100 mg/L letal wirkt. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, ***: $p\leq0,001$

3.3.2 Auswirkungen von Careo zum Gießen auf die Körperlänge von *X. laevis*

Die in CRG inkubierten Embryonen wurden auf phänotypische Veränderungen untersucht, beginnend mit der Körperlänge.

Hierfür wurden Embryonen in 0,1x MBSH als Kontrolle, und in CRG mit verschiedenen ACT-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10 und 50 mg/L, da 100 mg/L letal wirkte) inkubiert. Anschließend wurde die Körperlänge zunächst unter dem Lichtmikroskop analysiert (Abb. 34 B). Außerdem wurden die Körperlängen von zwei repräsentativen, unabhängigen Experimenten vermessen (Abb. 34 C). Bei der

Betrachtung der Embryonen unter dem Lichtmikroskop zeigte sich keine signifikante Längenreduktion, jedoch sind in 50 mg/L ACT tendenziell mehr Embryonen verkürzt. In der Ausmessung dagegen zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Embryonen ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L.

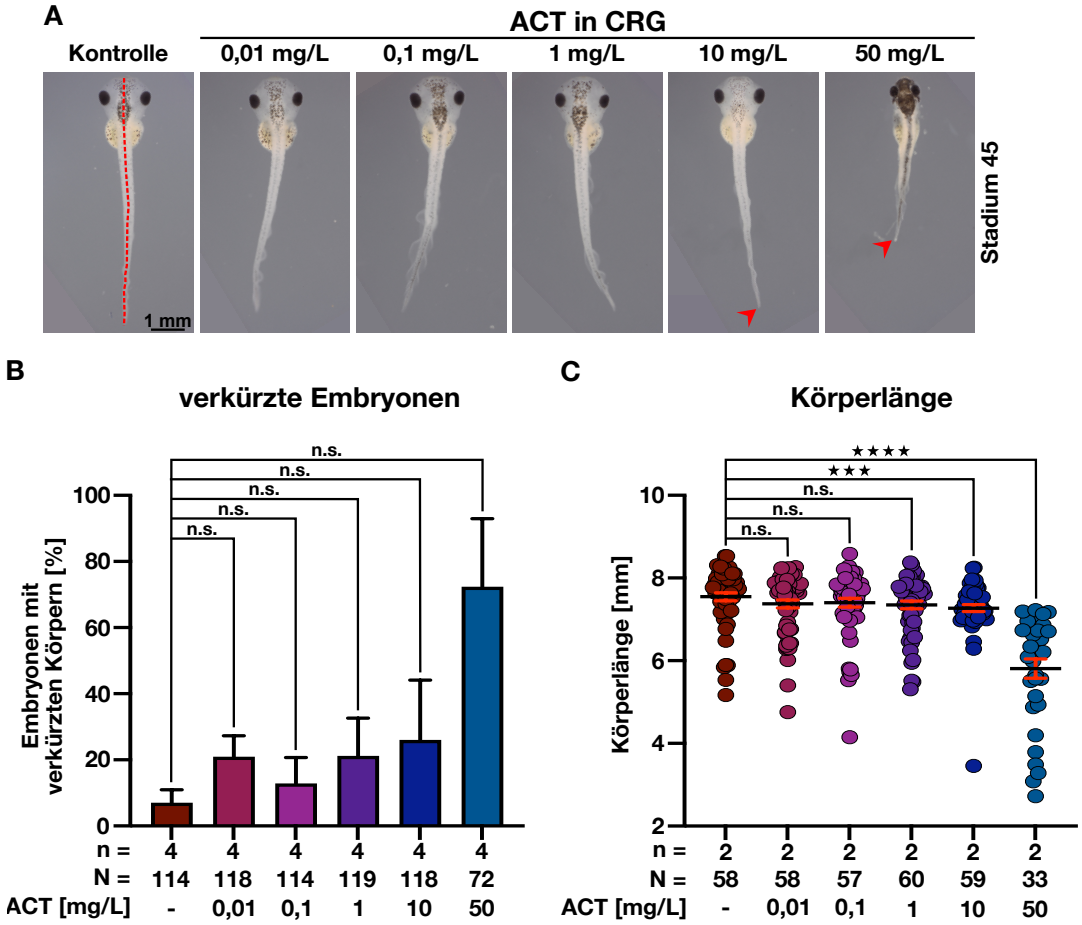

Abb. 34: Analyse der Auswirkungen von CRG auf die Körperlänge von *X. laevis*. A: Fotos von *X. laevis* Embryonen von dorsal. **B:** Statistische Auswertung der Körperlängen. Es zeigt sich keine signifikante Verkürzung, allerdings sind in 50 mg/L ACT tendenziell mehr Embryonen verkürzt. **C:** Ausmessung der Körperlänge in mm (rote Linie in A). Ab 10 mg/L ACT sind die Embryonen signifikant verkürzt (rote Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, ***: $p\leq0,001$, ****: $p\leq0,0001$

3.3.3 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* nach Inkubation mit Careo zum Gießen

Um bei CRG eventuelle Darmfehlbildungen darzustellen, wurden die Embryonen nach ihren makroskopischen Phänotypen im Darmbereich untersucht. Die Embryonen, die mit 50 mg/L ACT in CRG inkubiert wurden, zeigten signifikant mehr deformierte Därme als die Kontrollembryonen (Abb. 35 B).

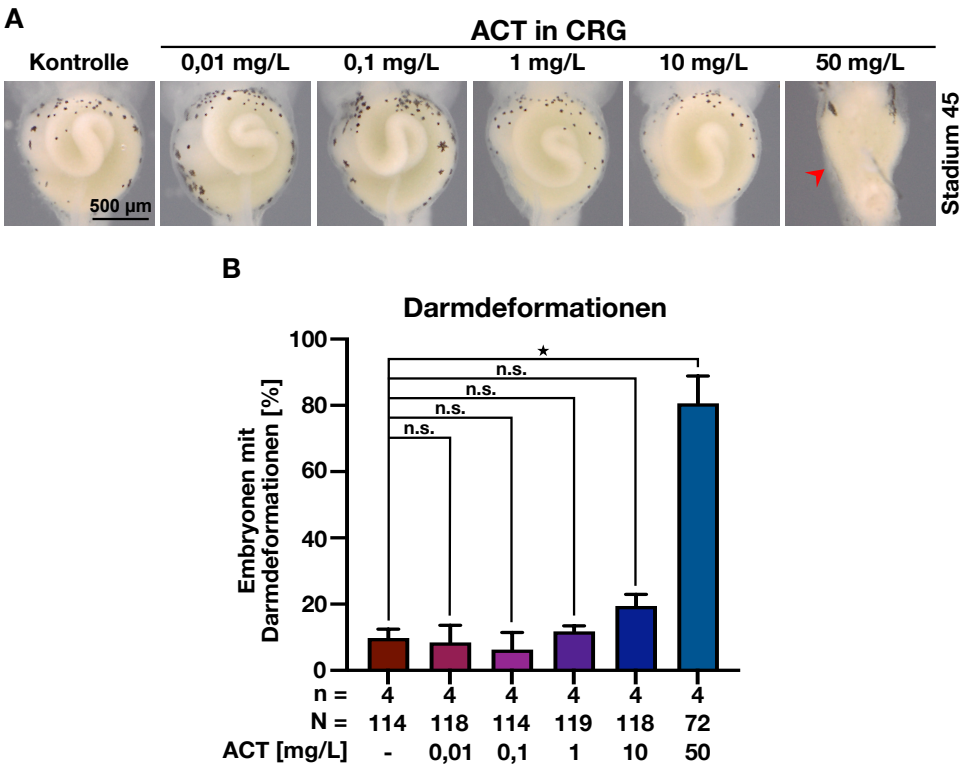

Abb. 35: Auftreten von Darmfehlbildungen nach Inkubation mit CRG. A: Ventrale Aufnahmen der Embryonen. Fokus auf die Darmregion. **B:** Anzahl an Embryonen mit Darmdeformationen der Kontrollen und der behandelten Embryonen. Die in 50 mg/L ACT in CRG inkubierten Embryonen zeigen verglichen mit der Kontrolle signifikant mehr Darmdeformationen. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$

5.3.4 Effekt von Careo zum Gießen auf die Augengröße bei *X. laevis*

Bei den mit CRG behandelten Embryonen wurden die Augenflächen zunächst lichtmikroskopisch mit den Kontrollen verglichen, und anschließend bei zwei unabhängigen Experimenten vermessen.

Bereits unter dem Lichtmikroskop zeigte sich bei einer signifikant hohen Anzahl Embryonen ab 0,1 mg/L ACT in CRG kleinere Augen, als bei den zugehörigen Kontrollembryonen (Abb. 36 B). Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurden zwei Experimente fotografiert und die Augenflächen vermessen. Hierbei zeigten sich ab 0,01 mg/L ACT in CRG signifikant verkleinerte Augen (Abb. 36 C).

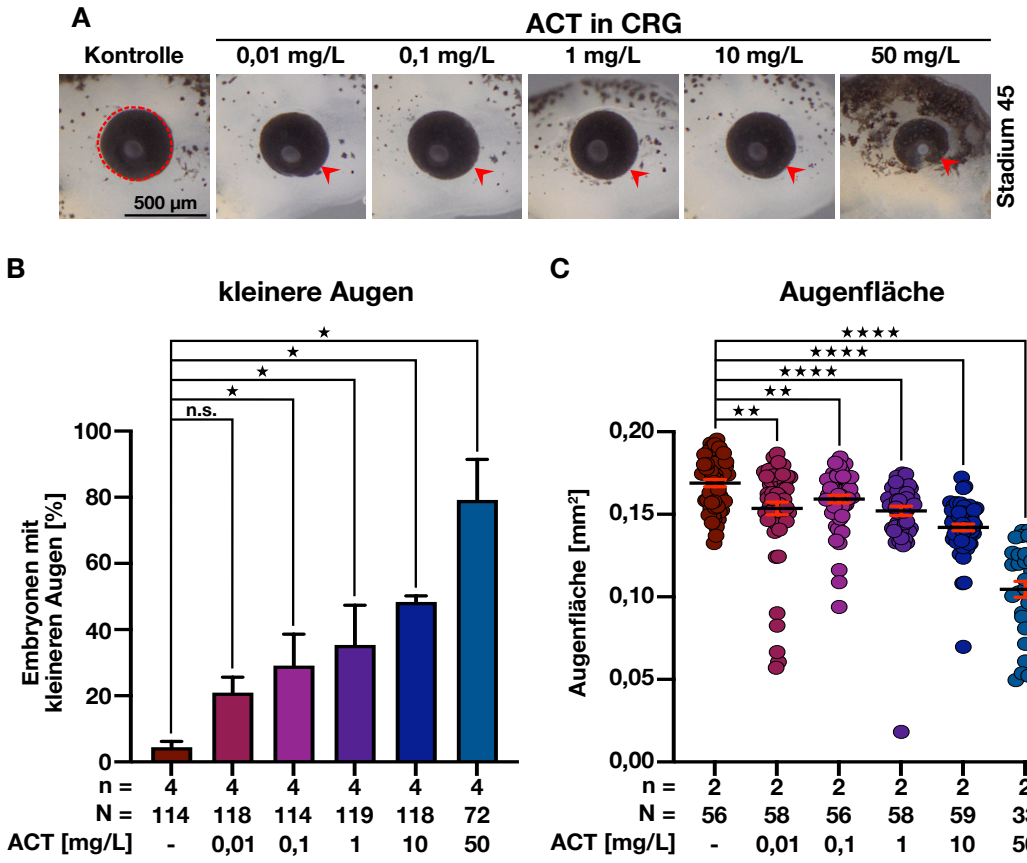

Abb. 36: Veränderung der Augengröße unter CRG-Einfluss. A: Vergrößerte Augenregion bei lateral aufgenommenen Embryonen. **B:** Bei der Analyse der Augengrößen unter dem Lichtmikroskop zeigt sich ab einer ACT-Konzentration in CRG von 0,1 mg/L eine signifikant höhere Anzahl an Embryonen mit kleineren Augen. **C:** Statistische Darstellung der gemessenen Augenflächen von zwei unabhängigen Experimenten (rote Linie in A). Alle mit CRG inkubierten Embryonengruppen zeigen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Augenflächen (rote Pfeile in A). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, **: $p\leq0,01$, ****: $p\leq0,0001$

3.3.5 Auswirkungen von Careo zum Gießen auf die Kopfmorphologie von *X. laevis*

Da sich bereits bei der äußeren Betrachtung der Embryonen Kopfödeme in den höheren ACT in CRG-Konzentrationen zeigten (Abb. 36 B), wurden die Embryonen zusätzlich nach ihren Kopfmaßen ausgewertet. Die Embryonen, die mit 50 mg/L ACT in CRG behandelt wurden, zeigten signifikant mehr Kopfödeme als die Kontrolle. Die lichtmikroskopisch analysierte Kopfbreite (Abb. 36 C) der Embryonen ergab eine signifikante Verkleinerung ab 10 mg/L ACT.

Zwei repräsentative vermessene Experimente zeigten signifikant kleinere Kopfflächen (Abb. 36 D) ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L. Zur

vollständigen Analyse der Köpfe wurde auch der Interokularabstand (Abb. 36 E) vermessen. Hier ergaben sich zunächst signifikant schmälere (0,01 mg/L ACT in CRG), dann breitere (1 mg/L ACT in CRG) und schlussendlich wieder schmälere Köpfe (ab 10 mg/L ACT in CRG).

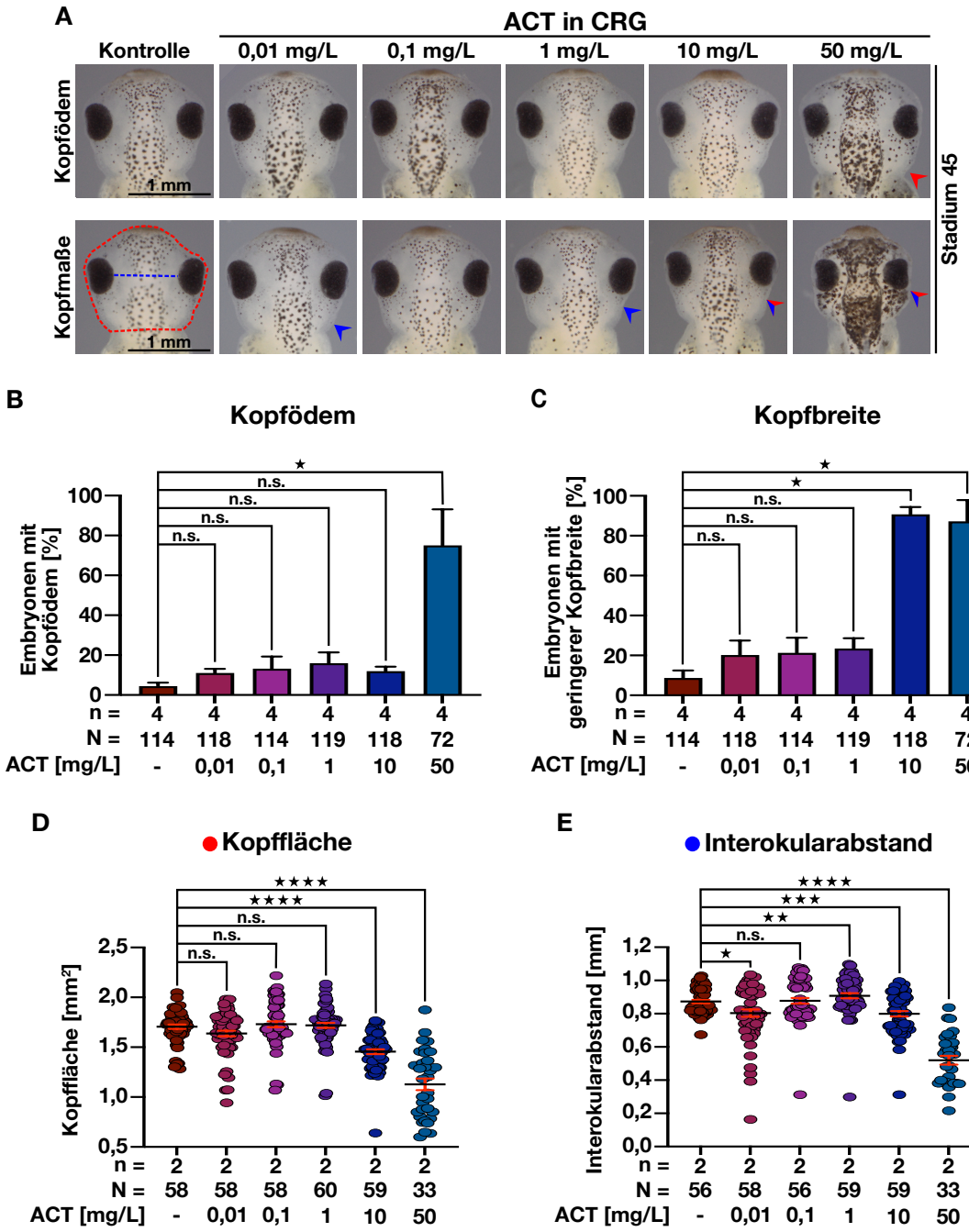

Abb. 37: Kopfmorphologie von *X. laevis* nach Inkubation mit CRG. A: Darstellung der Kopfödeme (obere Reihe) und der veränderten Kopfmaße (untere Reihe) nach CRG-Inkubation. **B:** Statistik der Anzahl an Embryonen mit Kopfödemen nach Inkubation mit CRG. Mit 50 mg/L ACT in CRG behandelte Embryonen zeigen signifikant mehr Kopfödeme als die Kontrolle (roter Pfeil in A, obere Reihe). **C:** Lichtmikroskopisch ausgewertete Kopfbreite der Embryonen. Ab 10 mg/L ACT in CRG gibt es signifikant mehr Embryonen mit kleineren Köpfen. **D:** Statistische Darstellung der gemessenen Kopffläche in mm (rote Linie in A, untere Reihe). Signifikante Kopfverkleinerung ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L (rote Pfeile in A, untere Reihe). **E:** Gemessener Interokularabstand der Kontroll- und CRG-Gruppen (blaue Linie in A, untere Reihe). Die Köpfe werden in 0,01 mg/L ACT zunächst signifikant schmäler, um dann in 1 mg/L signifikant breiter zu werden. Ab 10 mg/L ACT sind sie wieder signifikant schmäler (blaue Pfeile in A, untere Reihe). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05, *: p≤0,05, **: p≤0,01, ***: p≤0,001, ****: p≤0,0001

3.3.6 Veränderungen der Herzmorphologie von *X. laevis* nach Inkubation mit Careo zum Gießen

Da die vorherigen Stoffe bereits Einfluss auf die Herzen von *X. laevis* gezeigt hatten, wurde auch nach CRG-Inkubation die Herzmorphologie und Funktion untersucht.
Auch hier wurden die Embryonen zunächst auf das Auftreten eines Herzödems untersucht (Abb. 37 B). Die Embryonen, die mit 50 mg/L ACT in CRG inkubiert wurden, zeigten signifikant mehr Herzödeme als die Kontrollen.
Anschließend wurde die Herzfrequenz der Kontrollen und der CRG-Gruppen gemessen (Abb. 37 C). Hierbei zeigte sich in den ACT-Konzentrationen 0,01 und 0,1 mg/L eine signifikante Herzfrequenzsteigerung. In den darauffolgenden Konzentrationen nahm die Frequenz zunächst ab, um dann in 50 mg/L ACT tendenziell wieder zu steigen.

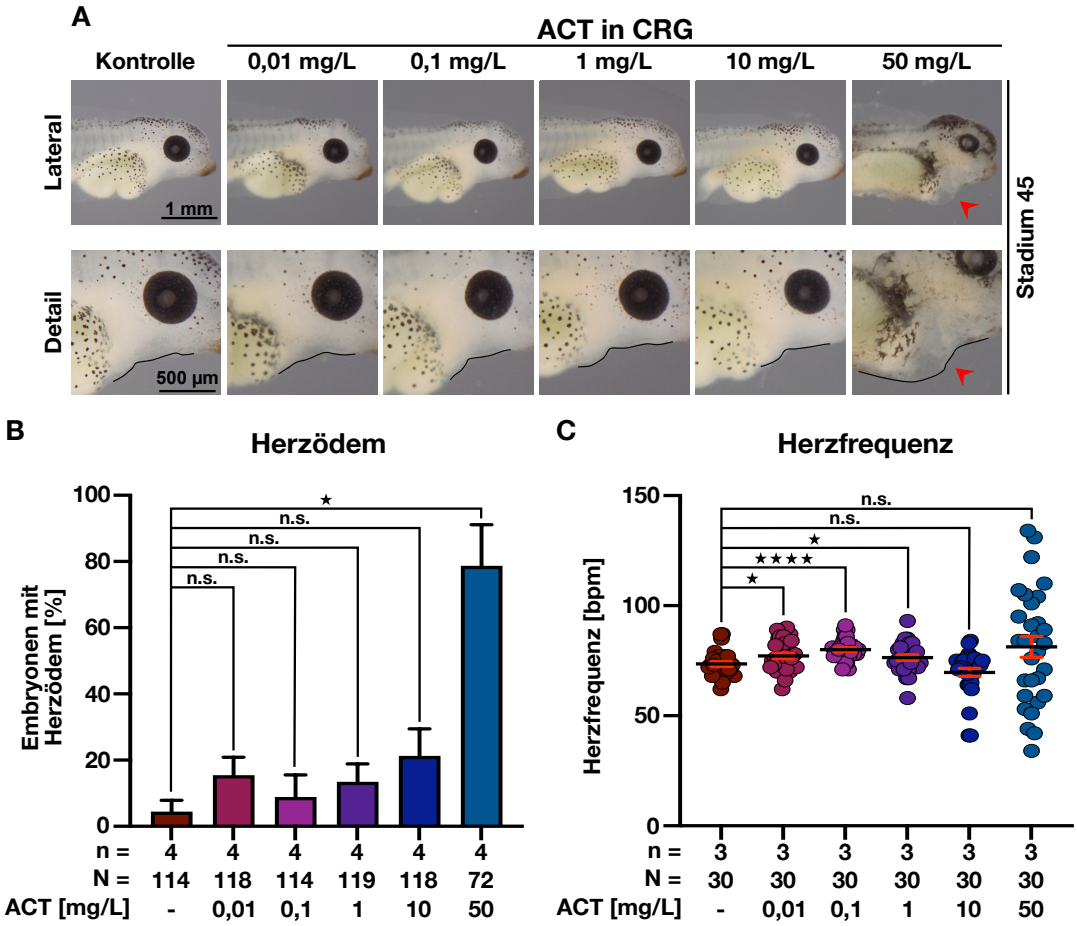

Abb. 38: Analyse der Herzmorphologie nach CRG-Inkubation. A: Obere Reihe: Übersichtsaufnahme der Embryonen von lateral. Untere Reihe: Detailansicht der Herzregion. **B:** Anzahl an Embryonen mit Herzödemen (schwarze Linie in A, untere Reihe). Die mit 50 mg/L ACT in CRG inkubierten Embryonen zeigen signifikant mehr Herzödeme (Pfeile in A). **C:** Statistik der gemessenen Herzfrequenz von drei unabhängigen Experimenten. Die Herzfrequenz steigt zunächst signifikant an (0,01 bis 1 mg/L ACT), um dann wieder abzufallen. Eine ACT-Konzentration von 50 mg/L lässt die Herzfrequenz tendenziell wieder ansteigen. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRG = Careo zum Gießen. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$, ****: $p\leq0,0001$

3.4 Ergebnisse zu Careo Rosenspray

3.4.1 Effekt von Careo Rosenspray auf die Mortalität von *X. laevis*

Als letzte Formulierung mit dem Wirkstoff ACT wurde das für Privatnutzer zugelassene Careo Rosenspray (CRR) untersucht. Zunächst wurde die Sterblichkeitsrate der Embryonen in verschiedenen ACT in CRR-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10 und 50 mg/L) betrachtet (Abb. 38).

Es zeigte sich, dass bereits in 1 mg/L ACT in CRR alle Embryonen starben.

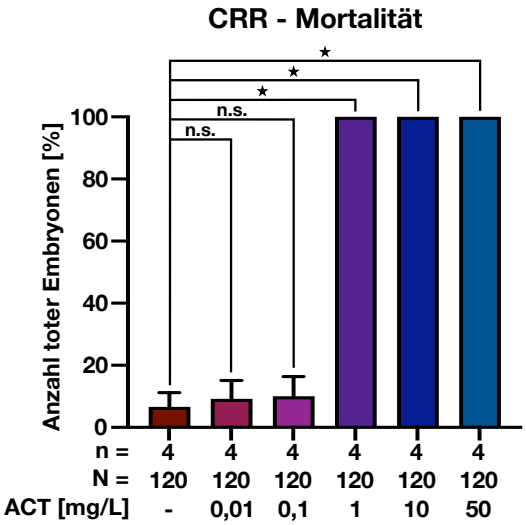

Abb. 39: Letalität von CRR bei *X. laevis* Embryonen. Nach der Inkubation von vier unabhängigen Experimenten in 0,1x MBSH (Kontrolle) und ACT-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10 und 50 mg/L) in CRR zeigt sich eine 100 % letal verlaufende und damit signifikante Wirkung von CRR ab 1 mg/L ACT. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$

3.4.2 Einfluss von Careo Rosenspray auf die Körperlänge von *X. laevis*

Da sich die Konzentrationen ab 1 mg/L ACT in CRR als letal erwiesen hatten, wurden die nachfolgenden Versuche nur noch mit den Kontrollen und den ACT-Konzentrationen 0,01 und 0,1 mg/L durchgeführt.

Für die Körperlänge ergab sich dabei folgendes Ergebnis. Es konnte unter dem Lichtmikroskop (Abb. 39 B) keine signifikante Anzahl an Embryonen ermittelt werden, deren Körperlänge kürzer war, als die der Kontrollen. Auch in der Ausmessung (Abb. 39 C) von zwei repräsentativen Experimenten ergab sich keine signifikante Längenänderung nach Inkubation mit CRR.

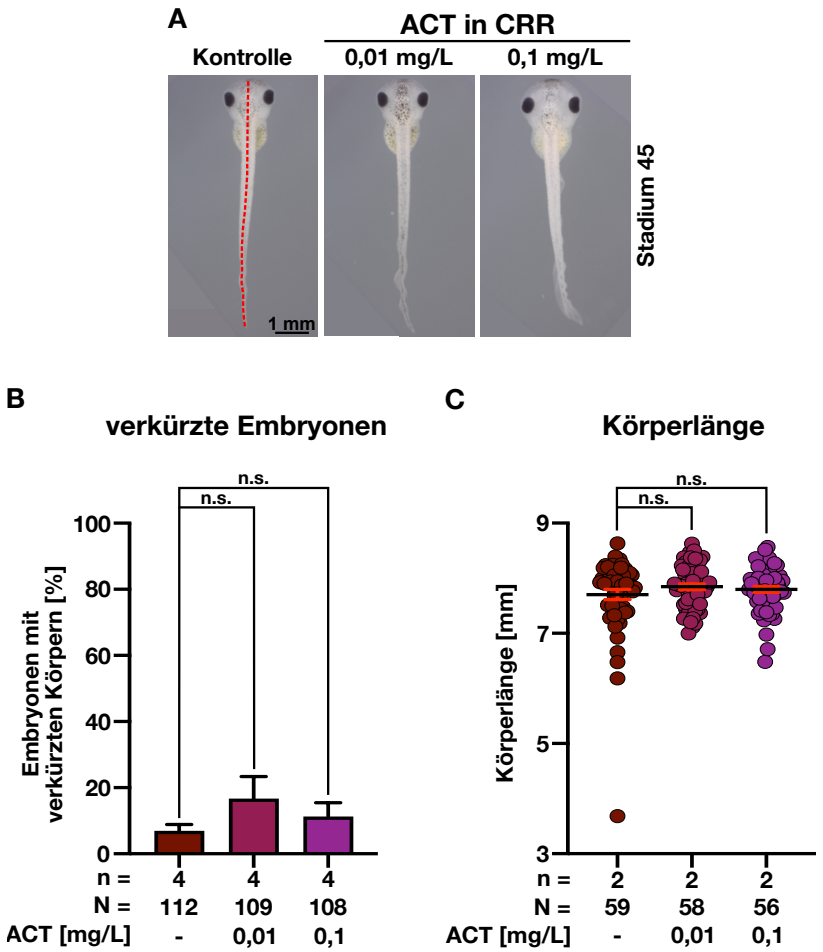

Abb. 40: Analyse der Körperlänge nach CRR-Inkubation. A: Dorsale Aufnahmen der Kontroll- und CRR-Gruppen. **B:** Auswertung der Körperlänge unter dem Lichtmikroskop. Es zeigt sich keine signifikante Anzahl verkürzter Embryonen. **C:** Statistische Darstellung der gemessenen Körperlänge (rote Linie in A). Die Embryonen der CRR-Gruppen zeigen keine signifikante Längenänderung. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05

3.4.3 Auftreten von Darmdeformationen bei *X. laevis* nach Inkubation mit Careo Rosenspray

Um das Ergebnis des Careo Rosensprays mit den anderen Stoffen vergleichen zu können, wurden die Embryonen dieses Stoffes ebenfalls auf mögliche Darmdeformationen (Abb. 40 B) untersucht.

Dieses Merkmal zeigte keine signifikanten Veränderungen.

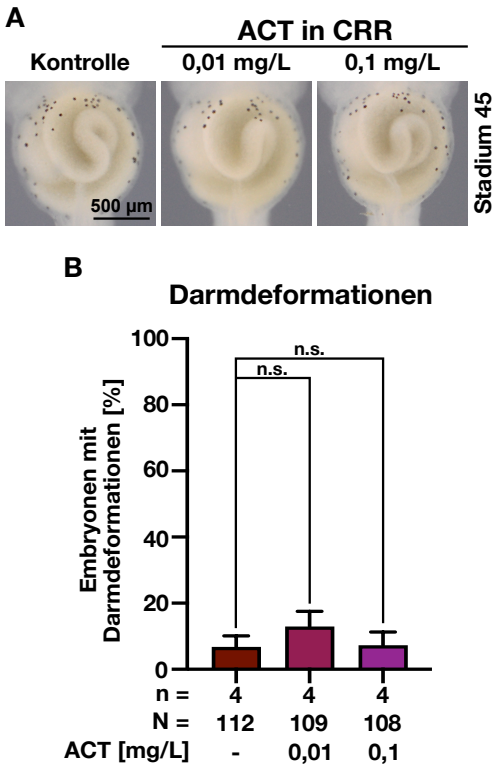

Abb. 41: Auftreten von Darmdeformationen nach Inkubation mit CRR. A: Ventrale Fotos der Intestinalregion repräsentativer Embryonen. **B:** Statistische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten. Es kann keine signifikante Anzahl an Darmdeformationen in den Insektizid-Gruppen gefunden werden. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$

3.4.4 Veränderungen der Augengröße von *X. laevis* nach Inkubation mit Careo Rosenspray

Im nächsten Schritt wurde der Kopfbereich genauer untersucht. Hierfür wurden zunächst die Augen genauer beurteilt.

Erst wurde die Augengröße bei vier unabhängigen Experimenten lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 41 B), und anschließend bei zwei der vier Experimente die Augenfläche der Embryonen vermessen (Abb. 41 C). Die unter dem Lichtmikroskop zunächst als signifikant verkleinerte Augenfläche bei 0,1 mg/L ACT definiert, zeigte sich in der anschließenden Ausmessung nicht.

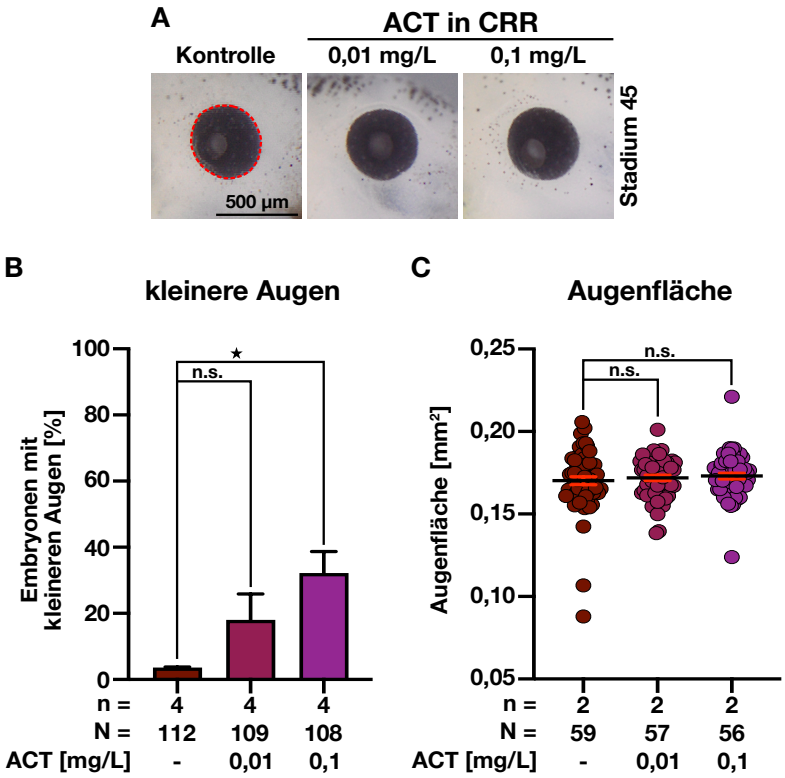

Abb. 42: Einfluss von CRR auf die Augenfläche bei *X. laevis*. A: Lateral fotografierte Embryonen, mit Fokus auf die Augenregion. **B:** Lichtmikroskopische Auswertung der Augengröße. Eine signifikante Anzahl der mit 0,1 mg/L ACT in CRR behandelten Embryonen zeigt kleinere Augen, als die Kontrolle. **C:** Gemessene Augenfläche in mm (rote Linie in A). Es ist keine signifikante Flächenänderung in den CRR-Gruppen erkennbar. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, *: $p\leq0,05$

3.4.5 Einfluss von Careo Rosenspray auf die Kopfmorphologie von *X. laevis*

Da die lichtmikroskopische Betrachtung der Embryonen veränderte Kopfstrukturen zeigte, wurden die Embryonen nach dem Auftreten von Kopfödemen (Abb. 42 B), und den Kopfmaßen untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Anzahl an Kopfödemen in den mit CRR behandelten Gruppen, verglichen mit der Kontrollgruppe.

Die Kopfgröße wurde zunächst lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 42 C), wobei sich keine signifikante Anzahl an Embryonen mit breiteren Köpfen ergab. Bei der anschließenden quantitativen Analyse der Kopfmaße wurde zunächst die Fläche vermessen (Abb. 42 D). Die mit 0,1 mg/L ACT in CRR behandelten Embryonen zeigten hier signifikant größere Kopfflächen, als die Kontrollen. Die Messung des Interokularabstandes (Abb. 42 E) ergab ebenfalls eine signifikante Größenzunahme in der 0,1 mg/L ACT-Gruppe.

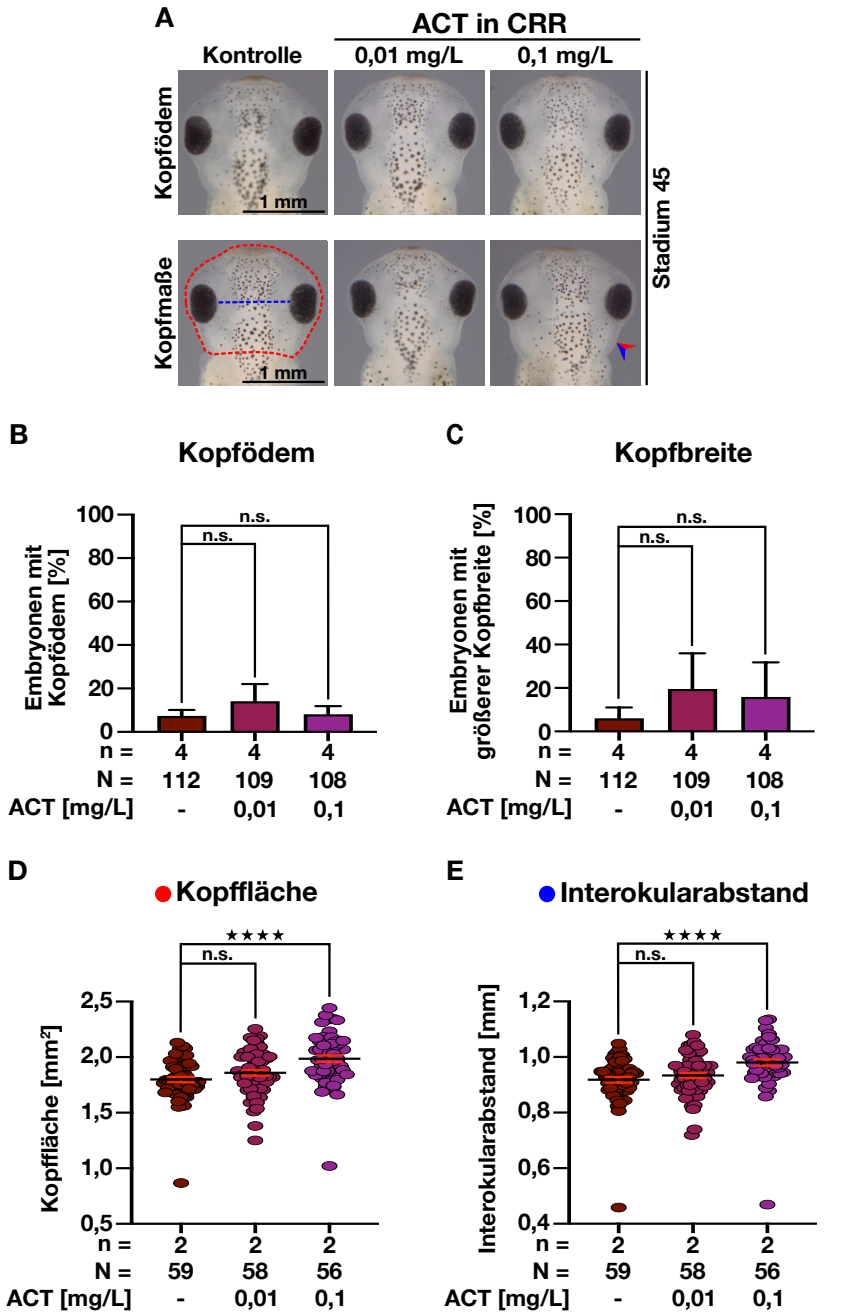

Abb. 43: Veränderte Kopfstruktur nach CRR-Inkubation. A: Fotos der Embryonen von dorsal mit Fokus auf die Bildung von Kopfödemen (obere Reihe) und die Kopfmaße (untere Reihe). **B:** Untersuchung der Embryonen nach dem Auftreten von Kopfödemen. Es kann keine signifikant höhere Anzahl an Kopfödemen in den CRR-Gruppen gefunden werden. **C:** Lichtmikroskopisch ausgewertete Kopfbreiten. Die Kopfbreite der CRR-Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant von den Kontrollen. **D:** Statistik der gemessenen Kopffläche (rote Linie in A, untere Reihe) von zwei Experimenten. Die mit 0,1 mg/L ACT in CRR behandelten Embryonen zeigen signifikant größere Köpfe (roter Pfeil in A, untere Reihe). **E:** Gemessener Interokularabstand in mm (blaue Linie in A, untere Reihe). Es zeigen sich signifikant breitere Köpfe nach Behandlung mit 0,1 mg/L ACT (blauer Pfeil in A, untere Reihe). **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: $p>0,05$, ****: $p\leq0,0001$

3.4.6 Effekt von Careo Rosenspray auf die Herzstruktur bei *X. laevis*

Um den Vergleich zu den anderen untersuchten Stoffen zu ermöglichen, wurde auch die Herzregion der CRR-inkubierten Embryonen untersucht, und mit einer 0,1x MBSH-Kontrolle verglichen. Hier zeigte sich keine signifikante Zunahme an Herzödemen (Abb. 43 B) in den CRR-Gruppen, verglichen mit den Kontrollgruppen.

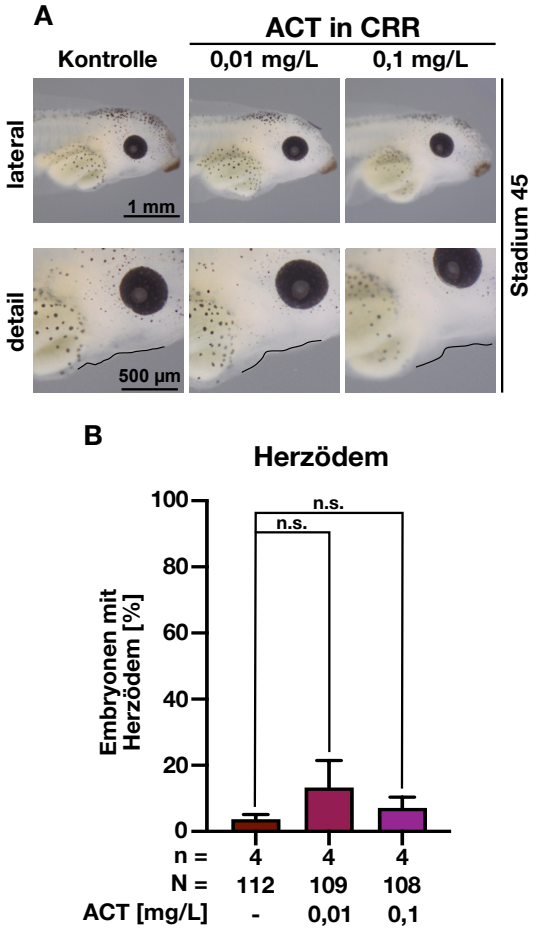

Abb. 44: Auftreten von Herzödemen nach CRR-Inkubation. A: Lateral aufgenommene Embryonen mit Fokus auf die Herzregion. **B:** Anzahl an Embryonen mit Herzödemen (schwarze Linie in A), statistisch dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die ACT-Konzentrationen (0,01 und 0,1 mg/L) in CRR keine signifikante Zunahme an Herzödemen. **Abkürzungen:** n = Anzahl der unabhängigen Experimente, N = Anzahl der untersuchten Embryonen, n.s. = nicht signifikant, ACT = Acetamiprid, CRR = Careo Rosenspray. **Statistik:** Die statistischen Daten wurden mithilfe eines nichtparametrischen Man-Whitney t-Tests ausgewertet. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) n.s.: p>0,05

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um die Ergebnisse abschließend kurz zusammenzufassen und die Wirkung der Stoffe untereinander zu vergleichen sind die Erkenntnisse in der folgenden Tabelle (Tabelle 2) grafisch dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse. Die untersuchten Merkmale sind in Zeilen aufgeteilt, der Reinstoff ACT, beziehungsweise die ACT-haltigen Formulierungen in Spalten. Von jedem Stoff und Merkmal wurde das Ergebnis der ACT-Konzentrationen 1, 50 und 100 mg/L dargestellt. Bei den subjektiv ausgewerteten Merkmalen wurde die Anzahl der veränderten Embryonen in Prozent der Gesamtanzahl dieser Konzentration angegeben. **Abkürzungen:** ACT = Acetamiprid; DAN = Danjiri; CRG = Careo zum Gießen; CRR = Careo Rosenspray; x = Merkmal nicht untersucht; - = kein signifikantes Ergebnis; ⬇ = Parameter verglichen mit der Kontrolle verkleinert; ⬆ = Parameter im Vergleich zur Kontrolle vergrößert

	ACT			DAN			CRG			CRR		
[mg/L]	1	50	100	1	50	100	1	50	100	0,01	0,1	1
Mortalität	-	-	-	-	-	letal	-	~60 %	letal	-	-	letal
Körperlänge	-	⬇	⬇	-	⬇	x	-	⬇	x	-	-	x
Mobilität	x	x	⬇	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Darm-morphologie	-	~15 %	~40 %	-	~40 %	x	-	~80 %	x	-	-	x
Augengröße	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	x	⬇	⬇	x	-	-	x
Kopf-morphologie	⬇	-	-	⬆	⬆	x	⬆	⬇	x	-	⬆	x
Kopfödem	-	~60 %	~80 %	-	~80 %	x	-	~80 %	x	-	-	x
Herzfrequenz	-	-	⬆	-	⬆	x	⬆	-	x	x	x	x
Herzödem	-	-	~70 %	-	~60 %	x	-	~80 %	x	-	-	x
Herz Phänotyp	x	x	~90 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x

4. Diskussion

Verschiedene Pestizide werden heutzutage weltweit und in großen Mengen in der Natur angewendet. Über den möglichen Einfluss dieser Substanzen auf nicht-Zielorganismen ist bis heute nur wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Neonicotinoids Acetamiprid (ACT) in seiner Reinform und als Wirkstoff in drei verschiedenen Formulierungen – zugelassen für die landwirtschaftliche und auch private Nutzung – auf die Embryogenese des südafrikanischen Krallenfrosches, *X. laevis*, untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass ACT in seiner Reinform sowohl makroskopisch, als auch funktionell die frühe Entwicklung der Kaulquappe beeinträchtigt. Die käuflich unter anderem in Europa für den Privatanwender erwerblichen Formulierungen mit ACT als Wirkstoff zeigten ebenfalls verschiedene toxische Effekte auf die Embryonen.

4.1 Relevanz der eingesetzten Stoffkonzentrationen für die Natur

Die hier verwendeten ACT-Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L) übersteigen die in der EU bereits gefundenen Konzentrationen (in Deutschland 0,00024 mg/L) [30]. Jedoch konnten in den USA bereits 0,0441 mg/L ACT nachgewiesen werden [33]. Außerdem gibt es nur wenige Studien, die Pestizidrückstände in Gewässern untersucht haben, und oftmals ist der Zeitpunkt und Ort der Probenentnahme nicht ideal gewählt. Zum Beispiel wurde nicht direkt nach Ausbringung der Pestizide auf den Feldern oder nach dem ersten Regenfall in nahe am Feld gelegenen Gewässern gemessen. Eine Aussage über die tatsächlich vorkommenden Konzentrationen in Gewässern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Ausbringung der Pestizide lässt sich somit nicht treffen. Dies wäre wichtig, um die Verteilung der Pestizide in der Umwelt, beispielsweise durch Regenfälle, genauer nachvollziehen zu können. Auch sind keine Daten über die Rückstände nach möglichen Pestizidunfällen oder der nicht sachgemäßen Anwendung verfügbar. Nach Angaben auf der Herstellerwebsite soll beispielsweise das ACT-haltige Produkt „Danjiri“ bei der Anwendung auf Raps auf höchstens 200 mg/L ACT gelöst und dann ausgebracht werden [40]. Es ist somit vorstellbar, dass auch in Gewässern höhere Konzentrationen zu finden sind, als bisher nachgewiesen werden konnte.

Im Urin von Städtebewohnern aus Ghana wurden bereits bis zu 0,0088 mg/L N-Dysmethyl-Acetamiprid (ein Abbauprodukt von ACT) nachgewiesen [34]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen sollen die Auswirkungen von ACT-haltigen Pestiziden auf aquatische Lebewesen zeigen.

4.2 Wirkung des Reinstoffs ACT auf die Mortalität

ACT in den hier angewendeten Konzentrationen (0,01 bis 100 mg/L) zeigte keine signifikante Erhöhung der Sterblichkeit von *X. laevis*-Embryonen.

Allerdings bildet das Laborsetting keine natürlichen Bedingungen ab. So werden die Embryonen nach der Befruchtung im 2-Zell-Stadium vorselektioniert und nur die zu diesem Entwicklungszeitpunkt ideal Entwickelten (beispielsweise symmetrische Teilung der beiden Zellen) in den ACT-Lösungen inkubiert. Außerdem sind außer dem Pestizid ACT keine weiteren Stressoren (weitere Umwelttoxine; Temperaturveränderungen; Fressfeinde) vorhanden wie es in der Natur der Fall wäre.

Für andere aquatische Organismen wurden bereits deutlich niedrigere LC_{50}-Werte (Letale Konzentration 50, Konzentration, bei der 50 % der Individuen sterben) nach ACT-Behandlung festgestellt. So zeigte die Schwebegarnele *Americamysis bahia* eine LC_{50} von 0,066 mg/L, während 50 % der mexikanischen Flohkrebse *Hyalella azteca* bereits bei ACT-Konzentrationen von 0,0042 mg/L starben [6, 33]. Das deutet darauf hin, dass es sich bei *X. laevis* um einen sehr robusten Modellorganismus handelt, der trotz höherer Pestizidkonzentrationen unter Laborbedingungen überleben kann.

4.3 Acetamiprid beeinflusst Parameter des Aussehens und das Bewegungsmuster von *X. laevis*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ab einer ACT-Konzentration von 10 mg/L die Körperlänge der Embryonen signifikant reduziert ist. Dies deckt sich mit einer vorherigen Studie an Zebrafisch-Embryonen (*Danio rerio*). Diese wurden in einem Zeitraum zwischen 6 und 120 Stunden nach der Befruchtung beobachtet. Die niedrigste getestete Konzentration (54 mg/L ACT) führte zu signifikant verkürzten Zebrafisch-Embryonen [31]. Es wurde bereits gezeigt, dass Acetylcholin die

neuromuskuläre Entwicklung von Mäusen negativ beeinflusst [3]. Da ACT agonistisch am nAChR (nikotinischen Acetylcholinrezeptor) wirkt [17], ist es durchaus denkbar, dass auch ACT durch die Störung der neuromuskulären Entwicklung die Körperlänge negativ beeinflusst.

Auch das Bewegungsmuster der Embryonen wurde durch ACT beeinflusst. So zeigten sich die Embryonen der mittleren Konzentrationen als bewegungsaktiviert, während die mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen fast keine Bewegungen mehr zeigten (Abb. 13).
Die Bewegungsaktivierung könnte mit einem gesteigerten Fluchtreflex der Embryonen zusammenhängen. Eine Studie an Mäusen stellte bereits fest, dass das Neonicotinoid Clothianidin zu Angstverhalten und, damit einhergehend, erhöhter Bewegungsaktivität führte [32]. Hirai *et al.* untersuchte die Auswirkungen auf das Angstverhalten von Mäusen durch ACT, wobei sich ebenfalls eine Steigerung nach Aufnahme von ACT zeigte [20].
Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Mobilität der Embryonen nach Inkubation mit 100 mg/L ACT könnte der oxidative Stress sein, zu dem ACT führt. Eine Studie an menschlichen Trophoblastenzellen zeigte bereits, dass ACT zum Zelltod der Trophoblasten führt, welcher hauptsächlich durch oxidativen Stress ausgelöst wurde [16]. Die Induktion von Sauerstoffradikalen könnte auch bei *X. laevis* zu Zellstress und damit verminderter Energiebereitstellung führen.

Bei Betrachtung der Intestinalregion der Embryonen zeigten sich signifikant mehr deformierte Därme nach Inkubation mit 50 mg/L ACT. Embryonen derselben Konzentrationen hatten auch eine signifikant erhöhte Anzahl an Herzödemen, die sich bis in die Intestinalregion erstreckten. Diese Flüssigkeitsansammlung und die damit verbundenen veränderten Platzverhältnisse im Bauchraum des Embryos könnten zu Fehlfaltungen des Darmes und damit zu den beobachteten Darmdeformationen führen. Auch für Clothianidin, ein weiteres Neonicotinoid, welches strukturell starke Ähnlichkeit zu ACT aufweist, konnte bereits gezeigt werden, dass es bei *X. laevis*-Embryonen vermehrt zu deformierten Därmen kommt [7].

Auch die Augenentwicklung der Embryonen wurde durch ACT negativ beeinflusst. Ab 1 mg/L ACT waren die Augen signifikant verkleinert.
Dass Neonicotinoide die Augenentwicklung von aquatischen Lebewesen beeinflussen, wurde bereits am Zebrafisch (*Danio rerio*) festgestellt. Nach Inkubation der Zebrafisch-Embryonen mit Imidacloprid (einem weiteren Neonicotinoid) zeigten sie sowohl unvollständig entwickelte, als auch fehlende Pigmentierungen der Augen [42]. Auch die Behandlung mit Clothianidin führte zu einer Verkleinerung der Augen von *X. laevis*-Embryonen [7]. Da alle Wirkstoffe, die der Gruppe der Neonicotinoide angehören, ähnliche Strukturen und den gleichen Wirkmechanismus haben, ist es denkbar, dass sie am visuellen System über den gleichen Mechanismus zu Veränderungen führen.

Auch am restlichen Kopfbereich zeigen die Embryonen Veränderungen. So verringern sich Kopffläche und Interokularabstand bei 1 und 10 mg/L, bzw. 10 mg/L zunächst, um bei den Embryonen der höheren ACT-Konzentrationen (ab 50 mg/L) wieder zu steigen.
Die Verkleinerung des Kopfbereichs kann durch den Einfluss von ACT auf die Gonadenhormone (Sexualhormone) erklärt werden. In einer Studie an männlichen Ratten zeigte ACT bereits das Potential, die Serumkonzentration von Testosteron zu senken [5]. Dass die Sexualhormone wichtig für die Entwicklung von *X. laevis*-Embryonen sind, zeigten Gray und Janssens. Sie wiesen nach, dass 1 nM des Schilddrüsenhormons T3 eine Verkleinerung des Kopfes der Kaulquappen bewirkte. Zusätzlich zur Inkubation mit T3 wurden die Sexualhormone Testosteron und Östradiol ins Wasser der Kaulquappen gegeben. Bei diesen Embryonen zeigte sich, dass die Verkleinerung durch die Sexualhormone verhindert werden konnte [18]. Es kann somit vermutet werden, dass die Verringerung der Serumkonzentration von Testosteron durch ACT einen Überhang der T3-Wirkung, und somit eine Verkleinerung des Kopfes bewirken könnte.
Die bei höheren ACT-Konzentrationen (ab 50 mg/L) auftretende Vergrößerung des Kopfes könnte mit den entstehenden Kopfödemen (ab 50 mg/L ACT) zusammenhängen. Durch die Einlagerung von Wasser in den Kopfbereich der Embryonen werden die Weichteilstrukturen gedehnt, und somit die Kopffläche und der Interokularabstand größer.

4.4 Veränderungen der Neuralgewebe von *X. laevis* unter Acetamiprid-Einfluss

Nach Färbung und Isolierung der Kopfknorpel von Kontroll- und ACT-behandelten Embryonen zeigte sich zunächst eine Vergrößerung der kranialen Knorpel nach Behandlung mit niedrigeren ACT-Dosen von 0,1 mg/L. Die Höchstdosis von 100 mg/L ACT führte dagegen zu stark verkleinerten und deformierten Knorpelstrukturen.

Das Phänomen, dass ein potentiell toxischer Stoff auf den Organismus in geringerer Dosis zunächst einen positiven Einfluss hat, beispielsweise proliferationssteigernd wirkt, um dann seine Toxizität in z.B. einer Wachstumsreduktion zu zeigen, nennt sich Hormesis. Dieses Phänomen wurde erstmals bei Pflanzen nachgewiesen und wird dadurch erklärt, dass ein basales Stresslevel scheinbar gesundheitserhaltend auf den Organismus wirkt. Erst bei der Applikation von Dosen, die über dieses basale Stresslevel hinausgehen, zeigen sich die toxischen Effekte der Substanz [2].

Die anschließend drastische Verkümmerung der Knorpel könnte mit dem Einfluss der Neonicotinoide auf die Entwicklung der Neuralleistenzellderivate zusammenhängen. Die kranialen Knorpel der Embryonen sind Derivate der Neuralleistenzellen. Für Imidacloprid wurde bereits gezeigt, dass es die Anzahl an Neuralleistenzellen in Hühnerembryonen signifikant reduziert, und dadurch zu Defekten in den Schädelknochen der Hühner führt [44].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Expression des Neuralleistenmarkers *egr2* zeigte eine tendenziell höhere Anzahl an Embryonen mit verändertem Expressionsmuster gegenüber den Kontrollen. Bei *egr2* handelt es sich um einen Transkriptionsregulationsfaktor, der vor allem in wandernden Neuralleistenzellen exprimiert wird und wichtig für die korrekte Entwicklung von Nervengewebe, aber auch Knochen ist [27]. Das könnte darauf hindeuten, dass die Veränderungen der Knorpel durch eine veränderte Signaltransduktion in den Neuralleistenzellen verursacht werden. Zur genaueren Analyse ist eine weitere Überprüfung mit weiteren spezifischen Markergenen und einer höheren Experimentanzahl, um eine statistische Auswertung generieren zu können, angebracht.

Auch die Hirnnerven der mit ACT behandelten Embryonen waren negativ beeinflusst. Fünf unterschiedliche Hirnnerven wurden in 2D fotografiert und die Längenmessung ergab eine signifikante Verkürzung aller Nerven ab 10 mg/L ACT. Da die Nerven im Kopf des Embryos dreidimensional und nicht nur zweidimensional verlaufen, bildet diese Messung kein exaktes Bild der Nervenlänge ab. Unabhängig davon kann man von dieser Analyse eine Tendenz für den Einfluss auf die Hirnnerven durch ACT ableiten.
Um die Nervenlänge unabhängig zur Knorpelfläche zu betrachten, die durch ACT ebenfalls beeinflusst wird, wurden die Nervenlängen ins Verhältnis zur Knorpelfläche des Embryos gesetzt. Da das Verhältnis der dorsalen Hirnnerven keine oder nur teilweise signifikante Veränderung zeigte, deutet dies darauf hin, dass ACT die dorsalen Nerven nicht spezifisch beeinflusst. Die ventralen Nerven der mit ACT behandelten Embryonen waren allerdings auch im Verhältnis zur Fläche der Kopfknorpel signifikant verkürzt, was bedeutet, dass der Phänotyp spezifisch ist. Um der Ursache dieser Verkürzung genauer auf den Grund zu gehen, könnte man die Plakoden der Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien mittels einer Färbung untersuchen. Plakoden sind spezialisierte Ektodermregionen, die sich zu verschiedenen Organen, unter anderem auch Hirnnerven, entwickeln [36]. Eine mögliche Veränderung in der Expression der Plakoden könnte also auch eine Ursache für die Verkürzung der Hirnnerven sein.

In der konfokalen Darstellung der Hirnnerven zeigten sich bei den mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen aufgefaserte Nervenstrukturen, die weniger zielgerichtet erschienen, als die Nerven der Kontrollembryonen. Die Studie von Çamlıca *et al.* konnte ähnliche Effekte von ACT auf die Struktur der *N. ischiadici* von *Rana ridibunda*, dem Seefrosch, zeigen [9]. ACT wirkt also an peripheren und zentralen Nerven auf ähnliche Weise.

Auch die Entwicklung des Gehirns von *X. laevis* zeigt sich durch ACT beeinflusst. Die Vermessung isolierter Gehirne zeigte, dass 10 mg/L ACT zunächst zu einer Verkleinerung, 100 mg/L ACT wiederum zu einer Größenzunahme führte.

Für das Neonicotinoid Thiacloprid konnte K. Geiß bereits zeigen, dass die Fläche der Gehirne von *X. laevis*-Embryonen im Stadium 44/45 nach Inkubation mit 100 mg/L Thiacloprid signifikant reduziert waren [14]. Es konnten außerdem für Thiacloprid bereits neurotoxische Effekte bei Hühnerembryonen nachgewiesen werden [12]. Es ist somit denkbar, dass ACT durch die Neurotoxizität zu einer Wachstumsverminderung der Gehirne von *X. laevis* führt. Dass ACT in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke von Säugetieren zu überwinden, zeigte bereits eine Studie an Mäusen, indem ACT und seine Metabolite nach oraler Gabe im Hirngewebe nachgewiesen werden konnten [20]. Die neurotoxische Wirkung von ACT ist also auch für Säugetiere, wie den Menschen, relevant.
Die in höheren Konzentrationen (100 mg/L) gezeigte Flächenvergrößerung der Gehirne könnte mit den entstandenen Kopfödemen zu erklären sein. Die Flüssigkeitsansammlung im Kopfbereich verteilt sich gleichmäßig und führt so zu einem „Aufschwemmen“ des Gehirns, und somit zu einer Vergrößerung.

4.5 Acetamiprid verändert die Herzfunktion und -struktur von *X. laevis*

Die Embryonen der hohen ACT-Dosen zeigten signifikant mehr Herzödeme (100 mg/L) als die Kontrollembryonen.
Ein Grund könnte die leberschädigende Wirkung von ACT sein. Diese konnten Karaca *et al.* bereits bei 8-10 Wochen alten Ratten zeigen, wobei sich histologisch verändertes Lebergewebe bereits bei der geringsten ACT-Dosis von 12,5 mg/kg Körpergewicht zeigte [24].
Aszites, also die Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle, ist auch beim Menschen als Folge einer Leberschädigung bekannt [21]. Außerdem zeigte die Untersuchung der Auswirkungen von ACT auf Zebrafisch-Embryonen ein vermehrtes Auftreten von Herzödemen [31]. Auch bei *X. laevis* könnte die Leberschädigung zu einer Flüssigkeitsansammlung im Bauch- und Herzbereich führen, und damit das Bild der Herzödeme erklären.

Auch die Funktion der Herzen ist durch ACT beeinflusst. Bei der Untersuchung der Herzfrequenz ergab sich eine signifikante Erhöhung der mit 100 mg/L ACT behandelten Embryonen.

Dies könnte möglicherweise mit der Nikotin-ähnlichen Wirkung von ACT zusammenhängen. Bereits im Gehirn von Ratten konnten Hirai *et al.* nachweisen, dass ACT auf die gleiche Weise wie Nikotin wirkt [20]. Es ist daher denkbar, dass im Herz ein ähnlicher Mechanismus vorliegt. Da Nikotin am Herzen über den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) zunächst eine Herzfrequenzsenkung im weiteren Verlauf allerdings eine Herzfrequenzerhöhung induziert, könnte eine langfristige Exposition gegenüber ACT denselben Effekt haben [23]. Darüber, ob dies alleine an der längeren Expositionszeit, oder aber an der Wirkung auf eine bestimmte Rezeptorunterart liegt, kann im Moment nur spekuliert werden.
Eine weitere Erklärung für die Herzfrequenzerhöhung nach ACT-Exposition könnten die entstandenen Herzödeme sein. Durch die Druckerhöhung im Herzbereich des Embryos durch das Ödem könnte die Füllung des Ventrikels vermindert sein. Dadurch erhöht sich die Herzfrequenz, um das Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. Beim Menschen führt beispielsweise eine Herzbeuteltamponade (also eine Flüssigkeitsansammlung im Herzbeutel) ebenfalls zu einer Herzfrequenzerhöhung, um das verminderte Schlagvolumen auszugleichen [45].

Bei der Untersuchung der Herzmorphologie ergab sich ab 10 mg/L ACT eine signifikante Anzahl an Embryonen mit deformierten Herzen. In der 3D-Darstellung der Herzen zeigten sich ebenfalls deutlich veränderte Herzformen, aber auch die Herzwand stellte sich dünner, beziehungsweise weniger strukturiert dar. Die WMISH des Herzmarkers *mhca* (ein für den Herzmuskel wichtiges Protein) zeigte deutlich veränderte Expressionsmuster. Hierbei zeigte sich die Intensität der Expression gegenüber den Kontrollembryonen verringert, wohingegen die Fläche vergrößert war. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen, die sich später zum Myokard entwickeln, weniger zielgerichtet migrieren können, was zu der späteren veränderten Struktur und Form der Herzen führen könnte.
Bei Untersuchungen der Herzentwicklung von *Xenopus tropicalis* (tropischer Krallenfrosch), einem nahen Verwandten des hier untersuchten *X. laevis*, konnten Abu-Daya *et al.* zeigen, dass ein durch eine Mutation verändertes MYH6-Gen welches für *mhca* kodiert, zu stark veränderten Herzen führt. So war bei den im

Stadium 40 untersuchten Kaulquappen die Herzkammer stark dilatiert und die Wand verdünnt. Der Ausflusstrakt war dagegen stark verengt [1].

Dass *mhca* eine entscheidende Rolle bei der Herzentwicklung vom Menschen spielt, zeigt sich bei den Krankheitsbildern des hypoplastischen Linksherzsyndroms und der dilatativen Kardiomyopathie. Diese strukturellen Herzveränderungen beim Menschen gehen auch meistens mit einer genetischen Mutation im MYH6-Gen einher [41]. Es ist somit durchaus denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression von *mhca* und der strukturellen Veränderung der Herzen bei den mit ACT-behandelten *X. laevis*-Embryonen besteht.

4.6 Vergleich der Auswirkungen von Acetamiprid und seiner Formulierungen

Es wurden zusätzlich zum Reinstoff ACT drei Formulierungen untersucht, die ACT als Wirkstoff, jedoch zusätzlich noch andere, dem Anwender/Nutzer unbekannte Stoffe beinhalten. Bei diesen Stoffen handelte es sich um Danjiri (DAN), ein für den landwirtschaftlichen Gebrauch zugelassenes Granulat, Careo zum Gießen (CRG) als für den Privatanwender zugelassenes Konzentrat und Careo Rosenspray (CRR) ein ebenfalls für den Privatanwender zugelassenes Spray für Zier- und Nutzpflanzen.

Die mit diesen drei Stoffen inkubierten Embryonen wurden auf Sterblichkeit, makroskopischen Phänotyp und, im Falle von DAN und CRG, Herzfrequenzveränderungen untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass die Sterblichkeit der Embryonen bei allen drei Stoffen in den höheren Konzentrationen signifikant erhöht war. So zeigte sich bei DAN ab 100 mg/L ACT in DAN eine 100 % Letalität, nach Inkubation mit CRG starben bereits ab 50 mg/L ACT in CRG signifikant mehr Embryonen und CRR erwies sich bereits ab 1 mg/L ACT in CRR als letal. Der Reinstoff zeigte dagegen keine signifikante Mortalität in den untersuchten Konzentrationen. Das könnte darauf hinweisen, dass die Zusatzstoffe in den Formulierungen selbst toxisch auf *X. laevis* wirken, oder aber den toxischen Effekt von ACT verstärken. Was davon zutrifft, oder es sich um eine Kombination aus beiden Möglichkeiten handelt, lässt sich ohne Kenntnis über die Inhaltsstoffe nicht genauer feststellen.

Das Auftreten von Darmdeformationen, die reduzierte Augenfläche und das Auftreten von Kopf- und Herzödemen zeigte sich für DAN und CRG in ähnlichem Ausmaß, wie für ACT selbst. Die Effekte traten jedoch schon in geringeren Konzentrationen oder in höherem Maße auf als beim Reinstoff. Für CRR ließen sich keine Veränderungen dieser Parameter feststellen, allerdings konnten hier aufgrund der hohen Mortalität nur noch die zwei geringsten Konzentrationen untersucht werden.

Die signifikant höhere Anzahl Phänotypen in geringeren Konzentrationen lässt sich womöglich damit erklären, dass die Zusatzstoffe in den gebrauchsfertigen Präparaten die Toxizität von ACT erhöhen. Ähnliche Effekte konnten bereits für Imidacloprid und eine seiner Formulierungen gezeigt werden. Tisler *et al*. konnten zeigen, dass Confidor SL 200, ein Imidacloprid enthaltendes Produkt, bei Wasserflöhen (*Daphnia magna*), adulten Zebrafischen (*Danio rerio*) und Zebrafisch-Embryonen bereits bei geringeren Imidacloprid-Konzentrationen toxische Effekte zeigte als der Reinstoff. So lag die EC_{50} (die Konzentration, bei der 50% der Individuen eine Veränderung zeigten) für *Daphnia magna* bei Confidor SL 200 bei 38 mg/L Imidacloprid, während Imidacloprid selbst erst bei 97,9 mg/L Effekte zeigte. Bei den adulten Zebrafische lag die LC_{50} für Imidacloprid in Confidor bei 214 mg/L, die des Reinstoffes bei 241 mg/L. Die Zebrafisch-Embryonen hatten beispielsweise bereits bei geringeren Konzentrationen Imidacloprid in Confidor keinen Herzschlag mehr [42]. Diese Ergebnisse, und die Ergebnisse dieser Studie zu ACT zeigen, dass die Zusatzstoffe die negativen Einflüsse der Wirkstoffe oft deutlich verstärken.

Bei der Untersuchung der Kopfparameter (Kopffläche und Interokularabstand) zeigten die in DAN und CRR inkubierten Embryonen eine Größenzunahme. Die CRG-Embryonen zeigten dagegen eine Kopfflächenreduktion und bei Betrachtung der Interokularabstände eine Verschmälerung aber auch eine Verbreiterung je nach ausgesetzter Konzentration. ACT zeigte ein ähnliches Bild wie die CRG-behandelten Embryonen. ACT führte zunächst zu einer Flächenreduktion und Verschmälerung des Kopfes, ab 50 mg/L wurden die Köpfe allerdings wieder größer. Die verschiedenen Ergebnisse in den einzelnen Formulierungen deuten darauf hin, dass die Zusatzstoffe auch Einfluss auf die Kopfentwicklung haben.

Dabei verstärken sie die Effekte von ACT, heben sie durch einen gegenteiligen Effekt auf, oder überlagern den Effekt von ACT.

DAN führte bei den Embryonen, ebenso wie ACT zu einer Herzfrequenzerhöhung, wobei der Effekt bereits in geringeren Konzentrationen und in größerem Maße auftrat. Die Zusatzstoffe in DAN scheinen somit synergistisch zu ACT auf die Herzfrequenz zu wirken, und dessen Effekt zu verstärken. CRG zeigte nur für die Konzentrationen 0,01-1 mg/L eine signifikante Tachykardie. Das deutet darauf hin, dass die Wirkung von ACT zunächst verstärkt wird, dann jedoch antagonistische Effekte, wie beispielsweise eine erhöhte Toxizität, die Herzfrequenz wieder senken.

Die genaue Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kann nicht ermittelt werden, da die Zusammensetzung der Formulierungen nicht bekannt ist. Manche Parameter zeigen in den Formulierungen stärkere Veränderungen, als im Reinstoff. Das deutet auf eine additive oder synergistische Wirkung der Zusatzstoffe hin. Andere Phänotypen zeigen sich dagegen abgeschwächt, hier könnten antagonistische Wirkungen der Zusatzstoffe zugrunde liegen. Trotzdem lässt sich über die Funktion der einzelnen Organe keine genaue Aussage treffen, diese müssen weitere Untersuchungen zeigen. Es lässt sich jedoch eindeutig sagen, dass die Formulierungen mit den enthaltenen Zusatzstoffen die Embryogenese von *X. laevis* ebenfalls negativ beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Das Insektizid Acetamiprid (ACT) gehört zur Substanzklasse der Neonicotinoide und ist ein heutzutage weltweit in großen Mengen eingesetztes Pflanzenschutzmittel. Da diese Substanzen durch Auswaschen, Sickern und fehlerhafte Handhabung in umliegende Gewässer gelangen können, werden auch aquatische Lebewesen mit diesen Stoffen konfrontiert. Auch wir Menschen gelangen täglich mit Pflanzenschutzmitteln in Kontakt, da wir sie durch unsere Nahrung aufnehmen und Berufsgruppen, wie Landwirte, sind ihnen durch ihre Anwendung noch stärker ausgesetzt.

Über Auswirkungen der Neonicotinoide auf nicht-Zielorganismen ist bis heute nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen durch ACT auf die Embryonalentwicklung des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis (X. laevis)* untersucht, um mögliche Auswirkungen genauer zu beleuchten.

X. laevis-Embryonen wurden in Lösungen inkubiert, welche ACT in verschiedenen Konzentrationen (0,01, 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/L), entweder in seiner Reinform, oder in einer Formulierung enthielten. Es wurden makroskopische Veränderungen und Änderungen der Herzfrequenz betrachtet. Im Falle des Reinstoffes wurden zusätzlich die Mobilität, Kopfknorpel, Hirnnerven, Gehirn und Herz im Detail untersucht. Um möglichen molekularen Grundlagen der Veränderungen auf den Grund zu gehen, wurden Whole-mount *in situ* Hybridisierungen von spezifischen Neuralleistenzell- und Herzmarkern durchgeführt.

Für den Reinstoff ACT zeigte sich keine signifikante Mortalität der untersuchten Embryonen. Allerdings zeigten sich Körperlänge (ab 10 mg/L), Augenfläche (ab 1 mg/L) und Hirnnervenlänge (teilweise bereits ab 10 mg/L) signifikant reduziert. Zudem wurden vermehrt Darmdeformationen (ab 50 mg/L), Kopf- (ab 50 mg/L ACT) und Herzödeme (100 mg/L ACT) detektiert. Bewegungsgeschwindigkeit und Strecke zeigten sich in 0,1 und 10 mg/L ACT zunächst erhöht, bei den mit 100 mg/L ACT inkubierten Embryonen jedoch signifikant reduziert. Die Kopfknorpel zeigten sich in den niedrigeren Konzentrationen (0,1 mg/L) vergrößert, in den höheren (100 mg/L) verkleinert, während sich die Kopfmaße genau entgegengesetzt dazu entwickelten. Die Herzfrequenz war nach 100 mg/L ACT signifikant erhöht und es traten bereits ab 10 mg/L ACT Herzphänotypen auf.

Die Embryonen der Formulierungen Danjiri (DAN; ab 100 mg/L)), Careo zum Gießen (CRG; ab 50 mg/L)) und Careo Rosenspray (CRR; ab 1 mg/L) zeigten eine signifikant erhöhte Mortalität. Die Stoffe DAN und CRG zeigten in den meisten erhobenen Daten die gleichen Effekte wie der Reinstoff ACT, wobei sie oftmals bereits in geringeren Konzentrationen oder in verstärktem Maße auftraten.

Über die tatsächlich in der Natur vorkommenden Insektizid-Konzentrationen und die damit verbundene Belastung für Tier und Mensch ist noch wenig bekannt. Zur genaueren Analyse der gesundheitlichen Auswirkungen auf nicht-Zielorganismen bedarf es weiteren Studien.
Bis diese Auswirkungen genau untersucht sind, und auch darüber hinaus, muss die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln strenger kontrolliert, Anwender müssen im Umgang mit diesen Stoffen geschult und Rückstände in der Umwelt besser erfasst werden. Erst dann kann man Pflanzenschutzmittel, wie Acetamiprid als unbedenklich für uns, und unsere Umwelt betrachten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abu-Daya A, Sater A K, Wells D E, Mohun T J, Zimmerman L B: Absence of heartbeat in the Xenopus tropicalis mutation muzak is caused by a nonsense mutation in cardiac myosin myh6. Dev.Biol., 336: 20-29 (2009)

2. Agathokleous E, Kitao M, Calabrese E J: Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. Trends Plant Sci., 24: 318-327 (2019)

3. An M C, Lin W, Yang J, Dominguez B, Padgett D, Sugiura Y, Aryal P, Gould T W, Oppenheim R W, Hester M E, Kaspar B K, Ko C, Lee K: Acetylcholine negatively regulates development of the neuromuscular junction through distinct cellular mechanisms. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 107: 10702-10707 (2010)

4. Annabi E, Ben Salem I, Abid-Essefi S: Acetamiprid, a neonicotinoid insecticide, induced cytotoxicity and genotoxicity in PC12 cells. Toxicol Mech Methods, 29: 580-586 (2019)

5. Arıcan E Y, Gökçeoğlu Kayalı D, Ulus Karaca B, Boran T, Öztürk N, Okyar A, Ercan F, Özhan G: Reproductive effects of subchronic exposure to acetamiprid in male rats. Sci.Rep., 10: 8985-0 (2020)

6. Bartlett A J, Hedges A M, Intini K D, Brown L R, Maisonneuve F J, Robinson S A, Gillis P L, de Solla S R: Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, Hyalella azteca. Ecotoxicol.Environ.Saf., 175: 215-223 (2019)

7. Brendler C (2023) Auswirkungen auf die Xenopus Embryogenese durch das Neonicotinoid Clothianidin als Einzelstoff sowie in Kombination mit Imidacloprid und Thiacloprid. Med. Dissertation, Universität Ulm

8. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel. September 30, 2023, available: https://apps2.bvl.bund.de/psm/jsp/index.jsp [September 30, 2023]

9. Çamlıca Y, Bediz S C, Çömelekoğlu Ü, Yilmaz Ş N: Toxic effect of acetamiprid on Rana ridibunda sciatic nerve (electrophysiological and histopathological potential). Drug Chem.Toxicol., 42: 264-269 (2019)

10. Eimermacher M, Puchalla M: Pestizidatlas CC BY 4.0. (2022), available: https://www.boell.de/sites/default/files/2022-01/Pestizidatlas2022_Web_20220108.pdf [November 18, 2022]

11. Evergreen Garden Care: Sicherheitsdatenblatt „CAREO zum Gießen“, (2020), available: https://cdn02.plentymarkets.com/qy8vou75anhn/frontend/SDB/Scotts/66770_substral_careozumgieen_sicherheitsdatenblatt.pdf [September 19, 2022]

12. Farag M R, Alagawany M, Moselhy A A A, Said E N, Ismail T A, Di Cerbo A, Pugliese N, Ahmed M M: The Neonicotinoid Thiacloprid Interferes with the Development, Brain Antioxidants, and Neurochemistry of Chicken Embryos and Alters the Hatchling Behavior: Modulatory Potential of Phytochemicals. Biology (Basel), 11: 73. (2022)

13. Garriock R J, Meadows S M, Krieg P A: Developmental expression and comparative genomic analysis of Xenopus cardiac myosin heavy chain genes. Dev.Dyn., 233: 1287-1293 (2005)

14. Geiß K: Impact of thiacloprid on the early embryonal development of Xenopus laevis. Master thesis, Universität Ulm (2020)

15. Gessert S, Maurus D, Rössner A, Kühl M: Pescadillo is required for Xenopus laevis eye development and neural crest migration. Dev.Biol., 310: 99-112 (2007)

16. Gomez S D, Bustos P S, Sánchez V G, Ortega M G, Guiñazú N: Trophoblast toxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid and an acetamiprid-based formulation. Toxicology, 431: 152363 (2020)

17. Goulson D: REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J.Appl.Ecol., 50: 977-987 (2013)

18. Gray K M, Janssens P A: Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in Xenopus laevis tadpoles in vivo, but not in vitro. Gen.Comp.Endocrinol., 77: 202-211 (1990)

19. Hempel A, Kühl M: A Matter of the Heart: The African Clawed Frog Xenopus as a Model for Studying Vertebrate Cardiogenesis and Congenital Heart Defects. J Cardiovasc Dev Dis., 3: 21 (2016)

20. Hirai A, Sugio S, Nimako C, Nakayama S M M, Kato K, Takahashi K, Arizono K, Hirano T, Hoshi N, Fujioka K, Taira K, Ishizuka M, Wake H, Ikenaka Y: Ca(2+) imaging with two-photon microscopy to detect the disruption of brain function in mice administered neonicotinoid insecticides. Sci.Rep., 12: 5114-7 (2022)

21. Hou W, Sanyal A J: Ascites: diagnosis and management. Med.Clin.North Am., 93: 801-17 (2009)

22. Huyen V N, Van Song N, Thuy N T, Dung L T P, Hoan L K: Effects of pesticides on farmers' health in Tu Ky district, Hai Duong province, Vietnam. Sustainable Futures, 2: 100026 (2020)

23. Ji S, Tosaka T, Whitfield B H, Katchman A N, Kandil A, Knollmann B C, Ebert S N: Differential rate responses to nicotine in rat heart: evidence for two classes of nicotinic receptors. J.Pharmacol.Exp.Ther., 301: 893-899 (2002)

24. Karaca B U, Arican Y E, Boran T, Binay S, Okyar A, Kaptan E, Özhan G: Toxic effects of subchronic oral acetamiprid exposure in rats. Toxicol.Ind.Health, 35: 679-687 (2019)

25. Karlsson O, Svanholm S, Eriksson A, Chidiac J, Eriksson J, Jernerén F, Berg C: Pesticide-induced multigenerational effects on amphibian reproduction and metabolism. Sci.Total Environ., 775: 145771 (2021)

26. Kerner M, Flach H, Dietmann P, Kühl M, Kühl SJ: The impact of the insecticide acetamiprid on the embryogenesis of the aquatic model organism Xenopus laevis. Environ Toxicol Pharmacol., 103:104278. (2023)

27. Kitani-Morii F, Imamura K, Kondo T, Ohara R, Enami T, Shibukawa R, Yamamoto T, Sekiguchi K, Toguchida J, Mizuno T, Nakagawa M, Inoue H: Analysis of neural crest cells from Charcot-Marie-Tooth disease patients demonstrates disease-relevant molecular signature. Neuroreport, 28: 814-821 (2017)

28. Kolanczyk R C, Tapper M A, Sheedy B R, Serrano J A: In vitro metabolism of imidacloprid and acetamiprid in rainbow trout and rat. Xenobiotica, 50: 805-814 (2020)

29. Kühl M, Gessert S: Entwicklungsbiologie. UTB basics Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, S. 44-225 (2010)

30. Liess M, Liebmann L, Vormeier P, Weisner O, Altenburger R, Borchardt D, Brack W, Chatzinotas A, Escher B, Foit K, Gunold R, Henz S, Hitzfeld K L, Schmitt-Jansen M, Kamjunke N, Kaske O, Knillmann S, Krauss M, Küster E, Link M, Lück M, Möder M, Müller A, Paschke A, Schäfer R B, Schneeweiss A, Schreiner V C, Schulze T, Schüürmann G, von Tümpling W, Weitere M, Wogram J, Reemtsma T: Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. Water Res., 201: 117262 (2021)

31. Ma X, Li H, Xiong J, Mehler W T, You J: Developmental Toxicity of a Neonicotinoid Insecticide, Acetamiprid to Zebrafish Embryos. J.Agric.Food Chem., 67: 2429-2436 (2019)

32. Maeda M, Kitauchi S, Hirano T, Ikenaka Y, Nishi M, Shoda A, Murata M, Mantani Y, Tabuchi Y, Yokoyama T, Hoshi N: Fetal and lactational exposure to the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) dose of the neonicotinoid pesticide clothianidin inhibits neurogenesis and induces different behavioral abnormalities at the developmental stages in male mice. J.Vet.Med.Sci., 83: 542-548 (2021)

33. Morrissey C A, Mineau P, Devries J H, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro M C, Liber K: Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. Environ.Int., 74: 291-303 (2015)

34. Nimako C, Ikenaka Y, Akoto O, Bortey-Sam N, Ichise T, Nakayama S M M, Asante K A, Fujioka K, Taira K, Ishizuka M: Human Exposures to Neonicotinoids in Kumasi, Ghana. Environ.Toxicol.Chem., 40: 2306-2318 (2021)

35. Schlosser G: Induction and specification of cranial placodes. Dev.Biol., 294: 303-351 (2006)

36. Schlosser G, Northcutt R G: Development of neurogenic placodes in Xenopus laevis. J.Comp.Neurol., 418: 121-146 (2000)

37. Scotts Celaflor GmbH: Sicherheitsdatenblatt „CELAFLOR Schädlingsfrei Careo Rosenspray“, (2015), available: https://d.otto.de/files/18728254.pdf [September 19, 2022]

38. Shi J, Yang H, Yu L, Liao C, Liu Y, Jin M, Yan W, Wu X B: Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (Apis mellifera L.) workers. Sci.Total Environ., 738: 139924 (2020)

39. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces L P, Bonmatin J M, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons D W, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser D P, Krupke C H, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell E A, Morrissey C A, Noome D A, Pisa L, Settele J, Stark J D, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs J P, Whitehorn P R, Wiemers M: Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. Environ.Sci.Pollut.Res.Int., 22: 5-34 (2015)

40. Sumi Agro Ltd: Produktwebsite „Danjiri“, available: https://www.sumiagro.de/Promasprodukte/28.htm [September 20, 2022]

41. Theis J L, Zimmermann M T, Evans J M, Eckloff B W, Wieben E D, Qureshi M Y, O'Leary P W, Olson T M: Recessive MYH6 Mutations in Hypoplastic Left Heart With Reduced Ejection Fraction. Circ.Cardiovasc.Genet., 8: 564-571 (2015)

42. Tisler T, Jemec A, Mozetic B, Trebse P: Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. Chemosphere, 76: 907-914 (2009)

43. Vial J L, Taylor L: The status of amphibian populations: a compilation and analysis. IUCN, S. 1-2 (1993)

44. Wang C, Wang G, Wang X, Liu M, Chuai M, Lee K K H, He X, Lu D, Yang X: Imidacloprid Exposure Suppresses Neural Crest Cells Generation during Early Chick Embryo Development. J.Agric.Food Chem., 64: 4705-4715 (2016)

45. York N L, Kane C, Smith C S: Identification and Management of Acute Cardiac Tamponade. Dimens.Crit.Care Nurs., 37: 130-134 (2018)

46. Zhang H, Zhao L: Influence of sublethal doses of acetamiprid and halosulfuron-methyl on metabolites of zebra fish (Brachydanio rerio). Aquat.Toxicol., 191: 85-94 (2017)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit und mein Studium nie möglich gewesen wären.
Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Susanne Kühl für die fantastische Betreuung während meiner Arbeit bedanken, für die zahlreichen Tipps und die Zeit, die in mein Projekt und meine Arbeit investiert wurde.
Außerdem möchte ich mich beim gesamten Laborteam der liebevoll genannten „Froschgruppe“ bedanken.
Danke an Petra für die Geduld mit uns bei der Laborarbeit. Wir haben dich viele Nerven gekostet und du bist trotzdem immer ruhig geblieben.
Vielen Dank an Corinna und Anja die immer ein offenes Ohr hatten, sei es bei Fragen, oder auch einfach nur bei Sorgen und Nöten.
Vielen Dank an meine Familie, vor allem meine Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium niemals möglich gewesen wäre. Vielen Dank dass ihr immer an mich glaubt!
Danke an meinen Mann, der es mit mir wirklich nicht immer leicht hat, aber jeden Tag alles gibt und immer für mich da ist. Ohne dich wäre ich niemals so weit gekommen.
Außerdem vielen Dank an meine Freunde, die sich regelmäßig mein Gejammer anhören müssen, wenn es mal stressig ist. Vor allem danke an Lisa und Barbara. Lisa, dank dir macht das Studium sogar manchmal Spaß. Und danke Barbara für die langjährige Freundschaft und das Korrekturlesen der Arbeit.
Und last but not least: Hannah und Martina. Es war mir eine Ehre, ein halbes Jahr im Labor mit euch verbringen zu dürfen.
Hannah, du hast immer Zeit gefunden uns alles auch mehrfach zu erklären, weil wir es uns einfach nicht merken konnten, für Fehler wurden Lösungen gefunden und Arbeiten bei Zeitmangel aufgeteilt. Eigentlich solltest du einen Orden dafür bekommen, dass du uns ein halbes Jahr lang ausgehalten hast, ohne durchzudrehen.
Martina, wir haben uns gegenseitig fertig gemacht. Und gleichzeitig werde ich nie wieder jemanden finden, mit dem ich an einem wunderschönen Sommertag im

Labor sitzen, und Glee lauthals mitgrölen kann, ohne mir darüber Gedanken zu machen, wer uns hört (und uns dann vielleicht einweisen lässt).
Ohne euch beide wäre die Zeit im Labor nur halb so schön, lustig und bunt gewesen und deshalb wird dieser Sommer für immer einer der besten meines Lebens bleiben. Ich hätte vorher niemals gedacht, dass ich am Ende nicht nur auf eine tolle Zeit zurückblicke, sondern auch auf den Beginn einer Freundschaft.

Lebenslauf

Name: Marlen Jana Kerner

Geboren 1999 in Heidenheim an der Brenz

Akademische Laufbahn:

Oktober 2018 bis	Studium der Humanmedizin
November 2025	an der Universität Ulm
2018	Erreichen der allgemeinen Hochschulreife
	an der Maria-von-Linden Schule
	in Heidenheim an der Brenz

Publikationen:

Kerner M, Flach H, Dietmann P, Kühl M, Kühl SJ. The impact of the insecticide acetamiprid on the embryogenesis of the aquatic model organism Xenopus laevis. Environ Toxicol Pharmacol. 2023 Sep 20;103:104278. doi: 10.1016/j.etap.2023.104278. Epub ahead of print. PMID: 37734584.