Institut für Biochemie und molekulare Biologie

Institutsleiter: Prof. Dr. Michael Kühl

Auswirkungen der Neonicotinoide Thiamethoxam und Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis*

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

Julia Susanne Schneider

Geburtsort: Passau

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Kühl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Baumann

Tag der Promotion: 20.04.2023

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis III
II. Abkürzungsverzeichnis V
1. Einleitung 1
1.1 Hintergrund der Studie 1
1.2 Der südafrikanische Krallenfrosch *X. laevis* 2
1.2.1 Der Modellorganismus *X. laevis* 2
1.2.2 Die embryonale Entwicklung von *X. laevis* 2
1.2.3 Die Gehirnentwicklung von *X. laevis* 4
1.2.4 Die embryonale Entwicklung des Herzens von *X. laevis* 5
1.3 Die Neonicotinoide Thiamethoxam und Flupyradifuron 6
1.4 Ziel dieser Arbeit 9
2. Material und Methoden 11
2.1 Material 11
2.1.1 Organismen 11
2.1.2 Enzyme 11
2.1.3 Antikörper 11
2.1.4 Antisense RNA Proben 12
2.1.5 Lösungen und Puffer 12
2.1.6 Chemikalien 23
2.1.7 Laborgeräte 27
2.1.8 Verbrauchsgegenstände 29
2.1.9 Software Hersteller 30
2.2 Methoden 31
2.2.1 Arbeiten mit *X. laevis* 31
2.2.2 Analyse und Dokumentation der Embryonen 33
2.2.3 Auswertung von den Organen 34

2.2.4 Messung der Mobilität der *X.* Embryonen 37

2.2.5 Whole mount in situ Hybridisierung..... 38

3. Ergebnisse 43

3.1 Einfluss von Thiamethoxam auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* 43

3.1.1 Mortalitätsrate von Thiamethoxam auf die Embryonen von *X. laevis* 43

3.1.2 Einfluss von Thiamethoxam auf den generellen Phänotyp der Embryonen von *X. laevis* 43

3.2 Einfluss von Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* 48

3.2.1 Mortalitätsrate von Flupyradifuron auf die Embryonen von *X. laevis* 48

3.2.2 Auswirkungen von Flupyradifuron auf den generellen Phänotyp der Embryonen 49

3.2.3 Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Mobilität der Embryonen..... 50

3.2.4 Einfluss von Flupyradifuron auf die Augenentwicklung von *X. laevis* Embryonen 52

3.2.5 Einfluss von Flupyradifuron auf die Kopfentwicklung von *X. laevis* Embryonen 55

3.2.6 Einfluss von Flupyradifuron auf die Herzentwicklung von *X. laevis* Embryonen..... 64

4. Diskussion..... 71

4.1 Auswirkungen von Thiamethoxam 71

4.1.1 Mortalitätsrate bei mit Thiamethoxam inkubierten Embryonen von *X. laevis* 71

4.1.2 Einfluss von Thiamethoxam auf den Phänotyp der Embryonen von *X. laevis* 72

4.2 Einfluss von Flupyradifuron auf die Embryonen von *X. laevis*..... 75

4.2.1 Mortalitätsrate bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von *X. laevis* 75

4.2.2 Einfluss von Flupyradifuron auf den Phänotyp und die Mobilität der Embryonen von *X. laevis* 75

4.2.3 Einfluss von Flupyradifuron auf die Augenentwicklung der Embryonen von *X. laevis* ... 76

4.2.4 Einfluss von Flupyradifuron auf die Kopfentwicklung von *X. laevis* Embryonen..... 77

4.2.5 Einfluss von Flupyradifuron auf die Herzentwicklung der Embryonen von *X. laevis*..... 79

4.3 Vergleich der Neonicotinoide Thiamethoxam und Flupyradifuron 81

4.4 Relevanz der Studie..... 81

5. Zusammenfassung 83

6. Literaturverzeichnis 85

II. Abkürzungsverzeichnis

% *Prozent*
°C *Grad Celsius*
µ *Mikro*
a Atrium
Abb *Abbildung*
actc1 Actin Alpha Cardiac Muscle 1
alcam Activated-Leucocyte Cell Adhesion Molecule
AP *Alkaline Phosphatase*
Ap-2α adaptor related protein complex 2 subunit alpha
BSA *bovines Serumalbumin*
bzw beziehungsweise
$Ca(NO_3)_2$ *Calciumnitrat*
$CaCl_2$ *Calciumchlorid*
CHAPS *3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat*
cm *Zentimeter*
ddH_2O *bidestilliertes Wasser*
DEPC *Diethylpyrocarbonat*
DNA *Desoxyribonukleinsäure*
EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*
egr2 early growth response gene 2
EGTA *Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure*
FHF *erstes Herzfeld*
FLU Flupyradifuron
g *Gramm*, *Gramm*
h *Stunde*, *Stunde*
H_2O *Wasser*
H_2O_2 *Wasserstoffperoxid*
hCG *Humanes Choriongonadotropin*
HCL *Salzsäure*
HEPES *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
HNK human natural killer
isl1 ISL LIM Homeobox 1, *Insulin gene enhancer protein ISL-1*
KCL *Kaliumchlorid*
KH_2PO_4 *Kaliumphosphat*
l *Liter*
m *Milli*
M *Molar*
MAB *Maleinsäurepuffer*
MBSH *Modified Barth solution HEPES*
MEM *MOPS/EGTA/Magnesiumsulfatpuffer*
MEMFAT *MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Formaldehyd/Tween*
MEMPFA *MOPS/EGTA/Magnesiumsulfat/Paraformaldeyd*
MgCl *Magnesiumchlorid*
$MgCl_2$ *Magnesiumchlorid*
$MgSO_4$ *Magnesiumsulfat*, *Magnesiumsulfat*
mhcα Myosin heavy chain a
min *Minute*, *Minute*
mm *Millimeter*
MOPS *3-(N-morpholino) propane sulfonic acid*
n Anzahl unabhängiger Versuche
N Anzahl der ausgewerteten Embryonen
n4bp3 NEDD4 binding protein 3
Na_2HPO_4 *Dinatriumhydrogenphosphat*
Na_2HPO_4 *Natriumphosphat*
nAChR *nikotinischer Acetylcholinrezeptor*
NaCl *Natriumchlorid*, *Natriumchlorid*
$NaHCO_3$ *Natriumhydrogencarbonat*, *Natriumhydrogencarbonat*
NaOH *Natriumhydroxid*
Nkx2.5 NK2 Homeobox 5
NOEC *No observed effected concentration*
ns nicht signifikant
OCM *Oozyten Kulturmedium*
oft Ausflusstrakt
p Signifikanzwert
pax6 Paired Box 6
pax7 pairde box 7
PBS *Polybutylensuccinat*
rax Retinal homeobox protein
RNA *ribonucleid acid*
RNase *Ribonuklease*
rpm *Umdrehungen pro Minute*
s *Sekunde*
SDS *Natriumlaurysulfat*
SEM Standardfehler des Mittelwerts
SHF *zweites Herzfeld*

sox3 *SRY-box transcription factor 3*
SSC *saline sodium citrate*
TBE *TRIS-Borat-EDTA-Puffer*
TBS *Tris-buffered saline*
TBST *Tris-buffered saline Tween20*
TE *Tris/EDTA*
THX *Thiamethoxam*
tnnt2 *Cardiac Troponin T*
Tris *tris(hydroxymethyl)aminomethan*
Tween 20 *Polyoxyethylen-(20)-sorbitloester*
twist *?, twist family bHLH transcription factor*
v *Ventrikel*
WMISH *Whole mount in situ Hybridisierung*
X *Xenopus*

1. Einleitung

1.1 Hintergrund der Studie

Das Bewusstsein der Menschheit für Gesundheit, gute Ernährung und Tierschutz ist in den letzten Jahren stetig weiter angestiegen, weswegen Herkunft und Produktionshintergrund der Lebensmittel immer stärker hinterfragt werden. Um diesem Interesse an gesunder Ernährung und artgerechter Haltung gerecht zu werden, sind Studien notwendig, um mögliche Risikofaktoren, die von Substanzen wie Insektiziden ausgehen könnten, zu ermitteln.

Neonicotinoide sind Insektizide, die an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) binden und so die Weiterleitung von Impulsen stören. Sie werden zur Schädlingsbekämpfung verwendet und nehmen heutzutage eine große Stellung in der Landwirtschaft ein [2]. Der Einsatz von Pestiziden wird zum einen durch die zunehmende Industrialisierung der Landwirtschaft und der daraus resultierenden wachsenden Zahl an Monokulturen, zum anderen durch den Verzicht auf Fruchtfolgen und die dadurch bedingte Vermehrung von Schädlingen gefördert [11]. Da Pestizide über Luft, Boden und Wasser verbreitet werden und die Verteilung daher nicht kontrollierbar ist, stellen sie eine Bedrohung für das Ökosystem dar. Insektizide wie Neonicotinoide können durch Oberflächenabfluss und Ableitung in angrenzende Gräben ins Grundwasser gelangen und so Einflüsse auf Nichtzielorganismen wie Amphibien haben. Mögliche Folgen sind der Verlust der Biodiversität und die Zerstörung der Bodenbiomasse [55].

Insgesamt ist die Studienlage zu Auswirkungen von Pestiziden schwach, insbesondere die Auswirkungen auf aquatische Wasserorganismen. Ziel dieser Arbeit ist es daher den Einfluss der häufig verwendeten Insektizide Thiamethoxam und Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *Xenopus* (X.) *laevis* zu untersuchen.

1.2 Der südafrikanische Krallenfrosch *X. laevis*

1.2.1 Der Modellorganismus *X. laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *X. laevis* wird häufig als Modellorganismus für Untersuchungen der Embryogenese verwendet, da diese sehr gut erforscht ist. Zudem bietet er als Modellorganismus viele Vorteile. So können die Froschweibchen durch Injektion des humanen Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin (hCG) zur Eiablage angeregt und die in der Regel zahlreich vorhandenen Eier extrakorporal befruchtet werden. Weil die Eier mit einer Größe von etwa 1,2 mm groß sind und die embryonale Entwicklung extrakorporal stattfindet, ist eine Beobachtung und Analyse durch Zuhilfenahme eines Mikroskops möglich. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Entwicklung der Embryonen und die frühe Anlage und Differenzierung der einzelnen Organe, die größtenteils schon in frühen Stadien geschieht [23].

1.2.2 Die embryonale Entwicklung von *X. laevis*

Ein wichtiger Vorteil von *X. laevis* als Modellorganismus ist seine sehr gut dokumentierte Entwicklung während der Embryogenese.

Die Embryogenese beginnt mit der Verschmelzung der Eizelle und des Spermiums und einer sich entwickelnden Zygote. Dabei bestimmt die Lokalisation des Eintritts des Spermiums die dorso-ventrale Achse der Eizelle. Anschließend kommt es zur Rotation des Cortex, wobei sich die Eizelle von der sie umgebenden Vitellinmembran löst und sich nun aufgrund der Gravitationskraft die schwere dotterreiche Seite nach unten dreht. Ab der 12. Zellteilung, in dem die Transkription des Genoms beginnt, können sich die Zellen nun frei bewegen und durch den Embryo wandern [23]. Im Anschluss an die Blastula setzt die Gastrulation ein, in der sich durch Zellwanderungen und Differenzierungen die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm bilden, die sich dann zu bestimmte Regionen wie das zentrale Nervensystem oder die Skelett- und Herzmuskulatur weiterentwickeln (Abb. 1).

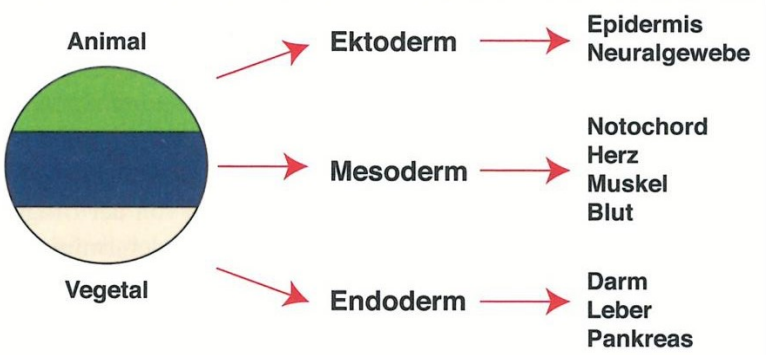

Abbildung 1: Frühe embryonale Entwicklung von X. laevis. *In der späten Blastula werden die drei Keimblätter (Ektoderm = grün; Mesoderm = blau; Endoderm = beige) angelegt. Während der weiteren Entwicklung entstehen daraus unterschiedliche Bereiche, wie beispielsweise die Epidermis oder das Herz* [23].

Die Gastrulation (Stadium 9 bis 12) beginnt mit Bildung des Archenterons aus dem Endoderm, das sich anschließend zur Blastopore ausbildet, die sich in das Innere des Embryos bewegt. Sowohl die endodermalen als auch die mesodermalen Zellen wandern durch den Blastoporus in das Innere des Embryos ein, wobei das Endoderm den Urdarm formt. Die ektodermalen Zellen bedecken die Oberfläche des Embryos, woraus sich die Epidermis und Neuralplatte bilden (Abb. 2A). Die nach der Gastrulation anschließende Neurulation findet in den Stadien 13 bis 19 statt. Hier bildet sich aus der Neuralplatte die Neuralfalte bis hin zum Neuralrohr, indem sich die Neuralplatte nach innen faltet und sich zudem die Epidermis ablöst (Abb. 2B).

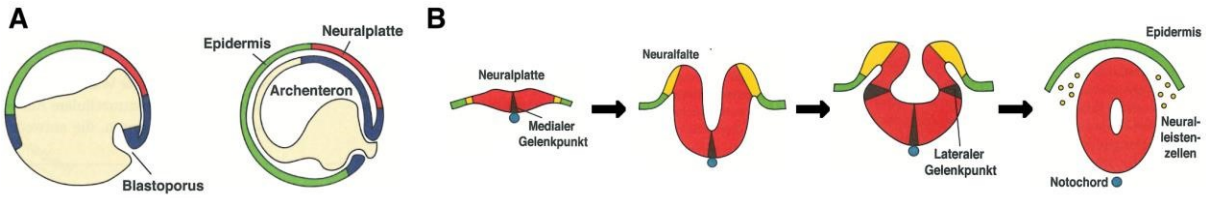

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gastrulation und Neurulation bei X. laevis. ***A*** *Gastrulation. Umstrukturierung der drei Keimblätter während der Gastrulation. Die endodermalen (beige) und mesodermalen (blau) Zellen wandern in den Embryo ein, während das Ektoderm sich über den gesamten Embryo zieht und aus diesem die Epidermis (grün) und Neuralplatte (rot) gebildet wird.* ***B*** *Neurulation. Aus der im Ektoderm induzierten Neuralplatte entsteht nach der Bildung der Neuralfalte das Neuralrohr (modifiziert nach [24] mit freundlicher Genehmigung von Prof. Susanne Kühl).*

Durch Verschluss des Neuralrohrs ist die Neurulation beendet [24].

1.2.3 Die Gehirnentwicklung von *X. laevis*

Wie in 1.2.2 erläutert entwickelt sich das Neuralgewebe aus dem ektodermalen Keimblatt. Aufgrund eines extrazellulären Wachstumsfaktors, der die Bildung neuraler Zellen in der animalen Kappe unterdrückt, sowie Induktoren im mesodermalen Keimblatt und dem Spemann-Organisator wird die Induktion des Neuralgewebes gesteuert. Aus diesem bildet sich dann das komplexe Nervensystem [25].

Das Neuralrohr, das sich während der Neurulation gebildet hat, entwickelt sich weiter in das anterior gelegene Gehirn und das posterior gelegene Rückenmark. Während sich der posteriore Bereich verschließt, entwickelt sich der anterior gelegene Bereich in die drei primären Gehirnbläschen Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon. Daraufhin entwickeln sich die Sekundärvesikel, wobei sich das Prosencephalon in das anteriore Telencephalon und das kaudale Diencephalon teilt. Im Gegensatz dazu kommt es beim Mesencephalon zu keiner weiteren Unterteilung. Das Rhombencephalon wiederum differenziert sich in das anteriore Metencephalon und das posteriore Myelencephalon (Abb.3) [25].

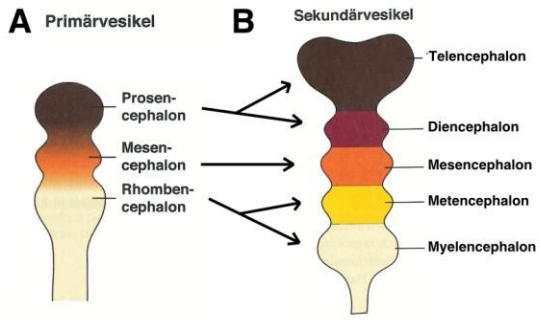

Abbildung 3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Gehirnbereiche. ***A*** *Aufteilung des anterioren Neuralrohrs in die drei primären Gehirnvesikel Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Hinterhirn).* ***B*** *Weitere Unterteilung der primären Gehirnbläschen in die Sekundärvesikel im Laufe der späteren Entwicklung (modifiziert nach* [25] *mit freundlicher Genehmigung von Prof. Susanne Kühl).*

1.2.4 Die embryonale Entwicklung des Herzens von *X. laevis*

Zu Beginn der Gastrulation (Stadium 10) entwickelt sich das Herz aus spezifizierten Zellen des Mesoderms als zwei bilaterale Herzvorläuferregionen auf der dorsalen Seite. Durch die Bewegungen während der Gastrulation (Stadium 12) kommt es zur Wanderung dieser beiden Flecken. Zu Beginn der Neurulation (Stadium 20) wandern die kardialen Vorläuferzellen in den vorderen Teil weiter, bis sie sich an der ventralen Mittellinie treffen und zu einer Herzanlage verschmelzen. Aus dieser ensteht der lineare Herzschlauch und später durch Umbauprozesse das reife Herz. In *X. laevis* entwickelt sich ein Drei-Kammer-Herz, das aus einem Ventrikel und zwei Atrien besteht sowie einem linksgekrümmten Ausflusstrakt. Der Ventrikel sowie die Atrien entstehen aus den Zellen des ersten Herzfeldes (FHF), während der Ausflusstrakt aus den Zellen des zweiten Herzfeldes (SHF) entsteht. Mit Hilfe molekularer Marker besteht die Möglichkeit, diese Vorgänge auf molekularer Ebene zu untersuchen. So spielt zum Beispiel das Gen *nkx2.5* eine wesentliche Rolle bei der Induktion der oben beschriebenen Herzfelder [54].

In Stadium 28 beginnt die Herzentwicklung mit der Differenzierung der Herzmuskelzellen, was durch das Vorhandensein des Markergens *mhc* α (myosin heavy chain alpha) bestätigt werden kann, das am Aufbau der schweren Myosinkette beteiligt ist [16].

1.3 Die Neonicotinoide Thiamethoxam und Flupyradifuron

Neonicotinoide sind Insektizide, die an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) binden und so die Weiterleitung von Impulsen stören (Abb. 4). Aufgrund ihrer negativ geladenen Nitro- oder Cyanogruppe sind Neonicotinoide selektiv gegenüber Insekten und interagieren mit höherer Affinität mit deren nAChR als mit den Rezeptoren von Säuge- und Wirbeltieren [50]. Sie werden daher seit 1990 zum Schutz gegen Insektenschädlinge verwendet [33]. Eine wichtige Rolle auf dem Weg zur Entwicklung der Neonicotinoide spielte Nithiazin. Dieses Insektizid ist an den nAChRs von Insekten aktiv, hatte aber eine mäßige Wirkung und eine schlechte Photostabilität. Daher wurde es selbst kein kommerzielles Produkt, wurde jedoch durch Hinzufügen einer 6-Chlor-3-Pyridyl-Gruppe, sowie einer Nitroimin-Gruppe verbessert, was zur Entwicklung von Imidacloprid, dem ersten Neonicotinoid, führte [33].

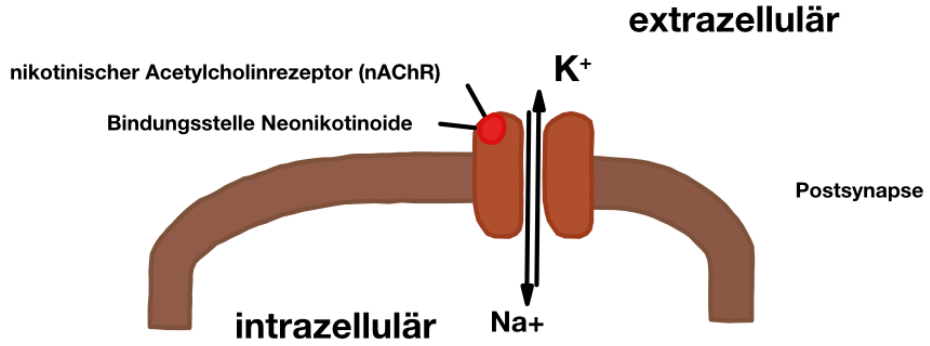

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus der Neonicotinoide. *Nach Bindung eines Neonicotinoids wird der Ionenkanal aktiviert und öffnet sich. Der Einstrom von Na+- Ionen in das postsynaptische Neuron führt zur Bildung von Aktionspotentialen, die weitere Neuronen und spätere Effektorzellen aktivieren.*

Durch Weiterentwicklung wurden im Lauf der Jahre immer neue Neonicotinoide auf den Markt gebracht, die beispielsweise eine höhere Affinität zu Insekten aufwiesen [22]. Gleichzeitig werden Substanzen, bei denen eine zu schädliche Wirkung nachgewiesen

wurde, wieder verboten. Das im Jahr 2007 zugelassene Neonicotinoid Thiamethoxam enthält im Gegensatz zu dem Neonicotinoid Imidacloprid eine Methylgruppe (Abb. 5), die zu einem Anstieg der insektiziden Aktivität führt [32]. Es wurde im Jahr 2013 in Deutschland verboten, nachdem es als Ursache für das große Bienensterben im Jahr 2008 identifiziert wurde. Bis heute sind jedoch Notfallzulassungen möglich, wie Anfang 2021 in Schleswig-Holstein für die Saatgutbehandlung von Zuckerrüben und das, obwohl in der EU seit Mai 2018 ein Gerichtsurteil besteht, das die Verwendung von Thiamethoxam nur noch in dauerhaft errichteten Gewächshäusern erlaubt ist sowie für Saatgut, dass für die Verwendung in Gewächshäusern bestimmt ist [4]. Es besteht jedoch die Möglichkeit auf nationaler Ebene Ausnahmen zu genehmigen, wie es in Schleswig-Holstein der Fall war [5]. In anderen Ländern, wie beispielsweise im US-Bundesstatt Florida, wird Thiamethoxam wesentlich uneingeschränkter eingesetzt [46]. In einer aktuellen Studie wurden in den Jahren 2013 bis 2018 in Kanada an 13 verschiedenen Standorten das Vorkommen von 62 verschiedenen Pestiziden untersucht, wobei Thiamethoxam unter den drei am Häufigsten vorkommenden Pestiziden war [26]. Außerdem konnte Thiamethoxam bei allen Oberflächenabfluss- und Abflusswasserproben nachgewiesen werden, die am Rande eines 22,5 ha großen Feldes in Kanada entnommen wurden. Die Konzentrationen lagen bei 0,46 mg/l bis 2,2 mg/l [7], weshalb die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen in der hier vorliegenden Arbeit unter anderem in diesem Bereich liegen, um in der Natur vorkommende Konzentrationen beurteilen zu können.

Frühere Studien zeigten nach gezielter Exposition mit Thiamethoxam negative Auswirkungen auf Nichtzielorganismen wie auf Larven und ausgewachsene Tieren der Eintagsfliege *Cloeon diperum* [40]. Aquatische Organismen, wie die Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*, zeigten nach der Behandlung mit 100 mg/l Thiamethoxam subletale Symptome einschließlich dem Verlust des Gleichgewichtssinnes und ein verändertes Schwimmverhalten [14].

Nach dem Widerruf von Neonicotinoiden wie Thiamethoxam wurde unter anderem Flupyradifuron zugelassen, das auf dem pflanzlichen Alkaloid Stemofolin basiert [6]. Es enthält im Gegensatz zu den bisherigen Neonicotinoiden ein verändertes

Pharmakorsystem als bioaktives Gerüst mit einer Dihydrofuran-2-on-Gruppe, weshalb es in die Gruppe der Butenolide zählt (Abb. 5). Wie Neonicotinoide hat Flupyradifuron zudem einen Pyridinring [2]. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur und der gleichen Wirkungsweise wird es häufig als Neonicotinoid bezeichnet [34] [39]. Der N-2,2-Difluorethylrest von Flupyradifuron verursacht eine erhöhte insektizide Aktivität gegenüber Neonicotinoiden [22].

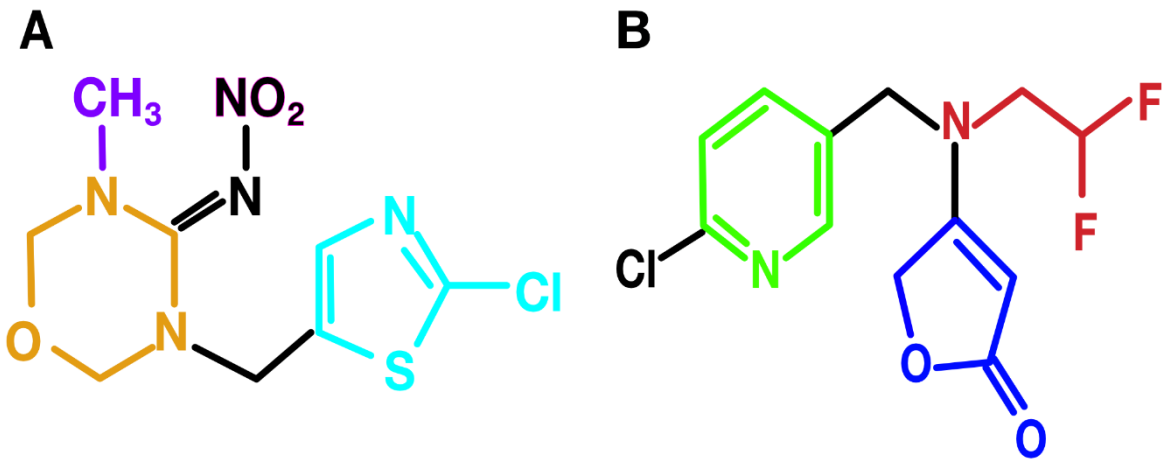

Abbildung 5: Chmische Strukturformel von Thiamethoxam und Flupyradifuron. A *Thiamethoxam besteht aus einem stickstoffhaltigem Heterocyclus (türkis), dem 1,3,5-Oxadiazinanring (orange) und dem Methylrest (lila) sowie der* NNO_2-Gruppe [32] **B** *Flupyradifuron besteht aus der Dihydorfuran-2-on-Gruppe (blau), dem Pyridinring (grün) und dem N-2,2-Difluorethylrest (rot)* [2].

Die Zulassung erfolgte 2014 zuerst in der Dominikanischen Republik und 2015 in den USA [51]. Im Rahmen des Zulassungsverfahren für Flupyradifuron mit dem Handelsnamen Sivanto von der Bayer CropScience AG in Deutschland wurde im Registrierungsbericht veröffentlicht, dass Flupyradifuron ins Grundwasser gelangen kann. In Deutschland wurde Flupyradifuron daher nur für die Verwendung in Gewächshäusern zugelassen. Da Flupyradifuron unter anderem eine hohe Toxizität für aquatische Wasserorgansimen aufweist, möchte man damit vermeiden, dass mehr als 0,1 µg/l Flupyradifuron ins Grundwasser gelangt [41]. Jedoch zeigt eine aktuelle Studie, dass

die Konzentration vieler Pestizide unter normalen Umständen höher als erlaubt und erwartet ist, weshalb die Möglichkeit besteht, dass beispielsweise durch unsachgemäßen Pestizidgebrauch die Konzentration von Flupyradifuron ebenfalls deutlich höher als erlaubt ist [27]. Es sollte daher auch für Flupyradifuron eine Überprüfung hinsichtlich des Vorkommens in der Natur durchgeführt werden, da bisher noch keine Daten zu diesem Insektizid vorliegen. Die „European Food Safety Authority“ gab 2015 eine Risikobewertung für Flupyradifuron heraus, in der sowohl bei der Feldanwendung als auch bei Anwendung im Gewächshaus durch Auswirkungen von Wasseraufbereitungsverfahren die Wahrscheinlichkeit einer Exposition ins Grundwasser als hoch eingestuft wurde [13]. Bisher wurden in verschiedenen Studien die Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Honigbiene untersucht. So zeigten Honigbienen Veränderungen hinsichtlich ihres Bewegungsmusters. Eine aktuelle Studie mit dem Zebrafisch *Danio rerio* als Modellorganismus zeigte nach Exposition mit Flupyradifuron multiple Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung, wie eine signifikante Reduktion der Körperlänge und der Herzfrequenz [57].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von den Neonicotinoiden Thiamethoxam und Flupyradifuron auf die frühe embryonale Entwicklung von *X. laevis* zu untersuchen, um einen Einblick auf mögliche Folgen für Nichtzielorganismen bei Verwendung dieser Insektizide in der Landwirtschaft zu gewähren.

Es wurden Embryonen im 2-Zell-Stadium bis zum Stadium 45 mit verschiedenen Konzentrationen von Thiamethoxam inkubiert, um anhand verschiedener Parameter die Unterschiede der exponierten Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen zu analysieren und zu dokumentieren. Nach mikroskopischer Auswertung der Embryonen unter Zuhilfenahme eines Mikroskops wurden sie bezüglich ihrer Körperlänge, Augen- und Kopffläche sowie der Kopfbreite vermessen. Anschließend wurde die Mobilität und die Herzfrequenz der Embryonen analysiert.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* wurden diese ebenfalls bis zum gewünschten Stadium inkubiert und die Körperlänge sowie die Mobilität der Embryonen beurteilt Nach mikroskopischer Auswertung und Vermessung des Auges und des Kopfes wurden Knorpel und Gehirn isoliert und analysiert. Durch Antikörperfärbungen wurden die kranialen Nerven detailliert untersucht und deren Längen quantitativ gemessen. Die Größe des Herzens wurde vermessen und mit einer Antikörperfärbung beurteilt. Außerdem wurde zur Beurteilung der Auswirkung auf das Herz eine Herzfrequenzmessung durchgeführt. Um Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Markergenanalysen in unterschiedlichen Organen durch Whole mount *in situ* Hybridisierungsexperimente (WMISH-Experimente) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Die für die Versuche benötigten adulten *X. laevis*-Frösche zur Gewinnung von Embryonen sind von der Firma Nasco (Wisconsin, USA).

Alle Experimente wurden vorschriftsmäßig nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Eine entsprechende Erlaubnis liegt dem Labor vom Regierungspräsidium Tübingen mit der Tierversuchsgenehmigung (Aktenzeichen 35/9185.82-3, Nr. I.89) vor.

2.1.2 Enzyme

Name	Firma
EcorI	Fa. New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
HindIII	Fa. New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
RNase A	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
RNase T1	Fa. Roche (Basel, Schweiz)

2.1.3 Antikörper

Name	Firma
Anti-Digoxygenin	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
3A10 Antikörper	Fa. DSHB (Iowa, USA)

Anti-mouse IgG	Fa. Dianova (Hamburg, Deutschland)
Cardiac Troponin T CT 3	Fa. DSHB (Iowa, USA)

2.1.4 Antisense RNA Proben

Für die Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) wurden die antisense Proben der Marker *actc1, rax, pax6, egr2, twist, alcam, sox3, n4bp3, isl1, nkx2.5, , mhcα,* verwendet.

2.1.5 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung		Menge/ pH
Alcianblaufärbelösung	0,5 g 40 ml 250 µl	1 % Alcianblau H_2O 0,5 % Eisessig aufgefüllt auf 50 ml mit ddH_2O	50 ml
Alkaline Phosphatase (AP)-Puffer	1 ml 500 µl 200 µl 100 µl	1 M Tris pH 9,5 1 M MgCl 5 M NaCl 10 % Tween 20 aufgefüllt auf 10 ml mit DEPC- H_2O	10 ml

Blocking-Solution (WMISH)	1 ml 25 µl 600 µl	5x MAB/10 % 10 % Tween 20 Horse Serum aufgefüllt auf 5 ml mit DEPC- H_2O	5 ml
10 % CHAPS	1 g	CHAPS aufgefüllt auf 10 ml mit DEPC- H_2O	10 ml
Deionisiertes Formamid	1 l 10 g	gekauftes Formamid 10 g Ionentauscher Serdolit MB-2 1 h rühren abfiltrieren	1 l
50x Denhardts	1 g 1 g 1 g	BSA Polyvinylpyrrolidon Ficoll 400 aufgefüllt auf 50 ml mit DEPC- H_2O	50 ml
DEPC- H_2O	1 l	ddH_2O	1 l

	1 ml	DEPC	
0,5 M EDTA	9,3 g	EDTA aufgefüllt auf 30 ml mit DEPC- H_2O pH auf 8,0 mit 10 M NaOH eingestellt aufgefüllt auf 50 ml mit DEPC- H_2O	50 ml pH 8,0
Enthüllungspuffer	10 g 500 ml	2 % L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat 0,1x MBSH aufgefüllt auf 400 ml mit ddH_2O pH auf 8,2 - 8,4 mit 10 M NaOH eingestellt aufgefüllt auf 500 ml 0,1x MBSH	500 ml pH 8,2-8,4
100 mg/l Flupyradifuron	50 mg	Flupyradifuron aufgefüllt auf 50 ml mit 0,1x MBSH	50 ml

50 mg/l Flupyradifuron	10 ml	100 mg/l Flupyradifuron aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
10 mg/l Flupyradifuron	2 ml	100 mg/l Flupyradifuron aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
1 mg/l Flupyradifuron	200 µl	100 mg/l Flupyradifuron aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
0,1 mg/l Flupyradifuron	20 µl	100 mg/l Flupyradifuron aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
Hybridisierungspuffer	25 ml 12,5 ml 1,0 ml 50 µl 500 µl 500 µl 500 µl	deionisiertes Formamid 20x SSC 50x Denhardts Heparin (100 mg/ml) 10 % Tween 10 % Chaps 0,5 M EDTA pH 8,0	50 ml

		aufgefüllt auf 50 ml mit DEPC- H_2O	
	50 mg	Torula RNA	
5x MAB	29,02 g	Maleinsäure	500 ml
	21,90 g	NaCl	pH 7,5
		in 400 ml DEPC- H_2O gelöst	
		pH auf 7,5 mit 10 M NaOH eingestellt	
		aufgefüllt auf 500 ml mit DEPC- H_2O	
5x MAB/10 % BMB	5 g	Blocking Reagenz	50 ml
		aufgefüllt auf 50 ml mit 5x MAB	
		autoklaviert	
0,1x MBSH	100 ml	1x MBSH	1 l
		aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	
1x MBSH	4,77 g	10 mM HEPES	2 l
	10,33 g	88 mM NaCl	pH 7,4
	149 mg	1 mM KCL	

	156 mg 121 mg 404 mg 403 mg	0,33 mM $Ca(NO_3)_2$ Heptahydrat 0,41 mM $CaCl_2$ Dihydrat 0,82 mM $MgSO_4$ 2,4 mM $NaHCO_3$	
5x MEM	104,65 g 3,80 g 1,23 g	0,5 M MOPS 10 mM EGTA 5 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O gelöst in 800 ml ddH_2O pH auf 7,4 eingestellt aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O Zugabe von 1 ml DEPC autoklaviert	1 l pH 7,4
1x MEMFAT	10 ml 500 µl 5 ml	5x MEM 10 % Tween 20 37 % Formaldehyd aufgefüllt auf 50 ml mit DEPC- H_2O	50 ml
1x MEMPFA	10 ml 5 ml	5x MEM 4 % Paraformaldehyd	50 ml

		aufgefüllt auf 50 ml mit ddH_2O	
1 % Methylcellulose	2,5 mg	Methylcellulose aufgefüllt auf 250 ml mit ddH_2O erhitzt auf 80 °C	250 ml
1 M $MgCl_2$	20,33 g	$MgCl_2$ aufgefüllt auf 100 ml mit DEPC- H_2O	100 ml
5 M NaCl	29,22 g	NaCl aufgefüllt auf 100 ml mit DEPC- H_2O	100 ml
10 M NaOH	40 g	NaOH Plättchen aufgefüllt auf 100 ml mit DEPC- H_2O	100 ml
10x PBS	80 g 2 g 14,4 g 1,5 g	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4	1 l pH 7,0

		gelöst in 800 ml ddH_2O pH auf 7,4 eingestellt aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	
1x PBS	100 ml	10x PBS aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	1 l
1x PBS + 0,3 % Triton X-100	5 ml 150 µl	10x PBS 20 % Triton X-100 aufgefüllt auf 50 ml mit ddH_2O	50 ml
1x PBS + 3 % Horse Serum	1 ml 300 µl	10x PBS Horse Serum aufgefüllt auf 10 ml mit ddH_2O	10 ml
1x PBS + 20 % Horse Serum	1 ml 2 ml	10x PBS Horse serum aufgefüllt auf 10 ml mit ddH_2O	10 ml

10x Proben-Ladepuffer	26,6 µl 500 µl 20 µl 0,025 g 5,8 ml	3M Tris/HCL pH 8,2 (40 mM) 10 % SDS (0,5 %) 0,5M EDTA pH 8,0 (1 mM) Bromphenolblau Glycerin (50 %) aufgefüllt auf 20 ml mit ddH_2O	10 ml
20x SSC	175,3 g 88,2 g	Natriumcitrat pH auf 7,0 eingestellt mit HCL aufgefüllt mit ddH_2O	1 l pH 7,0
2x SSC	100 ml	20x SSC aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	1 l
0,2x SSC	100 ml	2x SSC aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	1 l
10x TBE	108 g	Tris	1 l

	55 g 8,3 g	Borsäure Titriplex III (Na_2EDTA) aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	
1x TBE-Laufpuffer	100 ml	10x TBE-Puffer aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	1 l
10x TBS	80 g 2 g 30 g	NaCl KCl Tris base aufgefüllt auf 800 ml mit ddH_2O pH auf 7,4 eingestellt mit HCl Zugabe von 1 ml DEPC	1 l pH 7,4
1x TBST	100 ml 10 ml	10x TBS 10 % Tween 20 aufgefüllt auf 1 l mit ddH_2O	1 l
10 mM TE-Puffer/0,1 mM EDTA	0,33 ml 0,02 ml	3 M Tris/HCL, pH 8,0 0,5 M EDTA	100 ml

		aufgefüllt auf 100 ml mit ddH_2O; 0,2 µm Filtration	
TE/RNase A-Puffer 10 mg/l)	999 µl 1µg	10mM TE-Puffer/0,1 mM EDTA Lösung RNase A Stammlösung	1 ml
100 mg/l Thiamethoxam	50 mg	Thiamthoxam aufgefüllt auf 50 ml mit 0,1x MBSH	50 ml
50 mg/l Thiamethoxam	10 ml	100 mg/l Thiamethoxam aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
10 mg/l Thiamethoxam	2 ml	100 mg/l Thiamethoxam aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
1 mg/l Thiamethoxam	200 µl	100 mg/l Thiamethoxam aufgefüllt auf 20 ml mit 0,1x MBSH	20 ml
0,1 mg/l Thiamethoxam	20 µl	100 mg/l Thiamethoxam	20 ml

		aufgefüllt auf 50 ml mit 0,1x MBSH	
0,1 M Triethanolamin	750 µl 100 µl	Triethanolamin 32 % HCl aufgefüllt auf 50 ml mit DEPC- H_2O	50 ml
1 M Tris	12,11 g	Tris base pH auf 9,5 eingestellt mit HCl aufgefüllt auf 100 ml mit DEPC- H_2O	100 ml pH 9,5
20 % Triton X-100	20 ml	Triton X-100 aufgefüllt auf 100 ml mit ddH_2O	100 ml
10 % Tween 20	50 ml	Tween 20 aufgefüllt auf 500 ml mit ddH_2O	500 ml

2.1.6 Chemikalien

Material Hersteller

0,5 % Essigsäure	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
1 % Alcianblau	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
3-(N-morpholino) Propansulfonsäure	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
30 % Wasserstoffperoxid	Fa. Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
37 % Formaldeyd	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
4 % Paraformaldyhd	Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Aceticanhydrid	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Fa. Lonza (Basel, Schweiz)
Albumin Bovine (BSA)	Fa. Biofroxx (Einhausen, Deutschland)
Bidestilliertes H_2O	Klinikapotheke der Universität Ulm
Blocking Reagenz	Fa. Roche (Basel,Schweiz)
BM Purple AP	Fa. Roche (Basel,Schweiz)
Calciumchlorid ($CaCl_2$ x 2 H_2O)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Calciumnitrat ($Ca(NO_3)_2$ x 7 H_2O)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chaps	Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Denhardts	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
DEPC	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)

DIG RNA Labeling Mix	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Etyhlendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Ficoll 400	Fa. GE-Healthcare (Chicago/Illinois, USA)
Flupyradifuron	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Formamid	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Heparin	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Horse Serum	Fa. Gibco (Waltham/Masschusetts, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
L-Cysteinchloridmonohydrat	Fa. Sigma_Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)

Maleinsäure	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Midori Green Advance DNA Farbstoff	Fa. Biozym (Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Methylcellulose	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge	Fa. Roth (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge-Plättchen	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyvinylprrolidin	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
RNA-Polymerase (T7)	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
RNase Out	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
Salzsäure	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Thiamethoxam	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Transkriptions-Puffer	Fa. Roche (Basel, Schweiz)
Triethanolamin	Fa. Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Fa. AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Triton X-100	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.1.7 Laborgeräte

Material	Hersteller
Blockthermostat (HBT 2130)	Fa. HLC (Bovenden, Deutschland)
Digital Timer	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Eismaschine	Fa. Scotmans (Vernon Hills, USA)
Eppendorf Tubes 1,5/2 ml	Fa. Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Erlenmeyerkolben (250 ml)	Fa. Duran (Wertheim/Main, Deutschland)
Feinwaage	Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Fa. Liebherr (Bulle FR, Schweiz)
Heizblock	Fa. HLC (Bovenden, Deutschland)
Inkubator WB22K (12,5°C; 14°C)	Fa. Mytron (Heilbad, Deutschland)
Lichtmikroskop CH2	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Kamera Basler acA1300-30gc	Fa. Basler (Ahrensburg, Deutschland)
Kühlschrank (4 °C)	Fa. Liebherr (Bulle FR, Schweiz)
Magnetrührer	Fa. Ika (Staufen, Deutschland)
Messzylinder (1000 ml)	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Mikroskop BX60 und MVX10 mit	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)

Kameraadapter DP721Mikroskop SZH10	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Mikroskop SZX9	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
pH-Meter 211	Fa. Hanna-Instruments (Voeringen, Deutschland)
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Fa. HTL (Warschau, Polen)
Pipettierhilfe	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ringlicht LED	Fa. Optometron (Hofolding, Deutschland)
Roller	Fa. iDL (Nidderau, Deutschland)
Schott Glasflasche (250, 500 und 1000 ml)	Fa. Duran (Wertheim/Main, Deutschland)
Schüttler	Fa. Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Schwanenhälse	Fa. H. Saur (Reutlingen, Deutschland)
Titerplatte	Fa. Nunc
Vortex-Genie 2	Fa. Scientific Industries (Bohemia/NY, USA)
Waage EW4200	Fa. Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeschrank 37 °C	Fa. Memmert (Büchenbach, Deutschland)
Wasserbad	Fa. Memmert (Büchenbach, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge 15	Fa. Heraeus (Hanau, Deutschland)

Zentrifuge Heraeus™ Pico™ 17	Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge galaxy Mini centrifuge	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)

2.1.8 Verbrauchsgegenstände

Material	Hersteller
Falcons (15 ml; 50 ml)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Geldokumentationsgerät GenoSmart	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Werkstatt Uni Ulm
Glasröhrchen	Fa. VWR (Darmstadt, Deutschland)
Handschuhe S	Fa. Sempermed (Wien, Österreich)
Happy Skin soft Handschuhe S	Fa. Ulma (Neu-Ulm, Deutschland)
KIMTEC SCIENCE Präzisionstücher	Fa. Kimberly-Clark Professional (Koblenz, Deutschland)
Petrischalen	Fa. Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pinzetten	Fa. Dumbont Swiss (Montignez, Schweiz)
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß (Eppi 1,5 ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Skalpell	Fa. Braun Aesculap (Melsungen, Deutschland)
Sterilpipetten (5 ml; 10 ml)	Fa. Corning Incorporated (New York, USA)
Transferpipetten (3,5 ml)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (6- und 24-Wells)	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)

2.1.9 Software Hersteller

Affinity Designer 1.9.1	Fa. Serif (Nottingham, UK)
cellSens entry 1.13	Fa. Olympus (Shinjuku, Japan)
Ethovision XT 13	Fa. Noldus (Wageningen, Niederlande)
Excel	Fa. Microsoft (Redmond/Washington, USA
Fiji/ImageJ64	Fa. Wayne Rasband
GraphPad Prism 9	Fa. GraphPad Software (SanDiego, USA)
Pylon viewer (64x)	Fa. Basler (Ahrensburg, Deutschland)
Word	Fa. Microsoft (Redmond/Washington, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *X. laevis*

2.2.1.1 Gewinnung und Befruchtung der X. laevis Embryonen

Um die Froschweibchen zur Eiablage zu stimulieren, wurden ihnen von Ph. D. Studierenden und medizinischen Doktoranden 750-800 U β-humanes Choriongonatropin (hCG) zwischen Wirbelsäule und lateralem Seitenlinienorgan gespritzt. Am darauffolgenden Tag wurde stündlich durch extrakorporaler sanfte Massage und Ausstreichen des Bauches das Froschweibchen zum Ablaichen gebracht. Die Oozyten wurden daraufhin in Petrischalen gesammelt und nach Entfernung des überstehenden Wassers mittels einer vorher hergestellten Hodensuspension befruchtet. Der für die Suspension benötigte Hoden wurde in Oozyten Kulturmedium (OCM) für 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Ein Teil des Hodens wurde mit 1x MBSH verdünnt und homogenisiert. Nach erfolgter Befruchtung mit 0,1 - 0,3 ml der Hodensuspension wurde die Lösung in einem Verhältnis zu 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Bei Raumtemperatur wurden die befruchteten Oozyten anschließend 16 min inkubiert, um dann mit 0,1x MBSH im Inkubator bei 12,5 °C für mindestens 1 h inkubiert zu werden. Um die die Embryonen umgebende Hülle zu entfernen, wurden sie nach Ablauf dieser Stunde mit Enthüllungspuffer behandelt, gefolgt von Waschschritten mit 0,1x MBSH. Danach wurden die Embryonen bei 12,5°C bis zum Erreichen des Zwei-Zell-Stadiums inkubiert.

2.2.1.2 Inkubation der Embryonen mit Insektiziden

Für die Inkubation der Embryonen ab dem 2-Zell-Stadium mit den Pestiziden wurde eine Stammlösung mit 100 mg/l Thiamethoxam bzw. Flupyradifuron hergestellt. Mit 0,1x MBSH wurde diese auf die Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 50 mg/l verdünnt. Je 5 ml dieser Konzentrationen wurden in je zwei Wells einer 6-Well-Platte pipettiert.

Zusätzlich wurden zwei Wells mit je 5 ml 0,1x MBSH als Kontrolllösung gefüllt, in der parallel zu den Konzentrationen pro Well 15 Embryonen inkubiert wurden. Die Embryonen wurden anschließend bei 14 °C bis zum gewünschten Stadium inkubiert (Abb. 6).

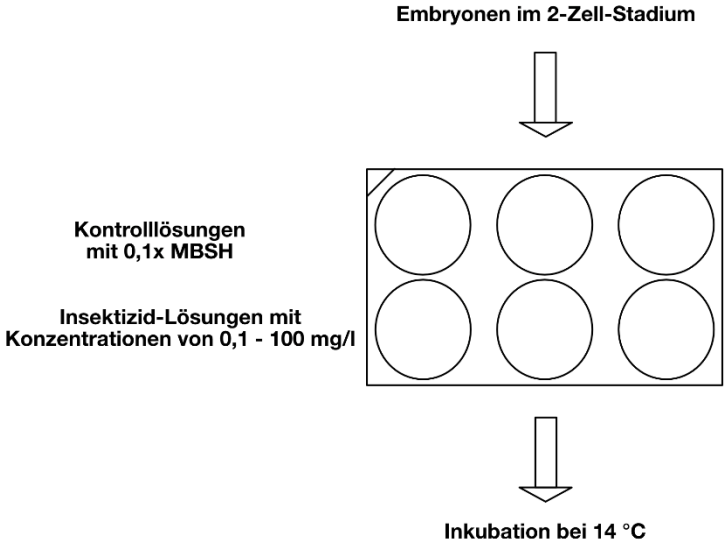

Abbildung 6: Schema zum experimentellen Aufbau der Inkubation mit Thiamethoxam bzw. Flupyradifuron. *Nach Befruchtung und Enthüllung der Eizellen wurden die Embryonen bei 12,5 °C inkubiert. Nach Erreichen des 2-Zell-Stadiums wurden in jede Vertiefung der 6-Well-Platte je 15 Embryonen überführt, die jeweils mit 5 ml Kontrolllösung (= 0,1x MBSH) oder Pestizidlösung in verschiedenen Konzentrationen gefüllt waren. Die Platten wurden bis zum gewünschten Stadium bei 14 °C inkubiert und die Embryonen anschließend mit 1x MEMFAT bzw. 1x MEMPFA fixiert.*

Je nach geplantem Versuch wurden die Embryonen größtenteils entweder in Stadium 20, 23, 28 und 32 (für WMISH) oder Stadium 45 mit 1x MEMFAT über Nacht bei 4 °C oder nach Erreichen des Stadiums 45 in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9,3 cm umgesetzt. Diese waren nur mit 0,1x MBSH gefüllt. Bei Raumtemperatur wurden die Embryonen nun bis Stadium 45/46 inkubiert und anschließend mit 1x MEMPFA für die Antikörperfärbung der kranialen Nerven und des Herzens bzw. mit 1x MEMFAT für die Knorpelisolierung über Nacht bei 4 °C fixiert.

2.2.2 Analyse und Dokumentation der Embryonen

2.2.2.1 Phänotypauswertung

Nach Erreichen des Stadiums 45 und Fixierung mit 1x MEMFAT wurden die Embryonen in 1x TBST umgepuffert, um sie mithilfe eines Mikroskops zu analysieren. Bei einem Phänotyp von über 20 % in der Kontrolle wurde der betroffene Versuch verworfen. Von den Kontrollembryonen wurde ein repräsentativer Embryo pro Versuch herausgesucht und dieser dann mit den Embryonen, die mit Thiamethoxam bzw. Flupyradifuron behandelt wurden, verglichen und die Abweichungen bezüglich der Körperlänge, Augengröße, Kopfbreite und Kopffläche dokumentiert. Mittels der Computer Software GraphPad Prism 9 wurden die prozentualen Zahlen in Statistiken dargestellt. Mit einem Olympus Mikroskop und dem Programm cellSense Entry wurde von den beiden repräsentativsten Versuchen Fotos der Kontrollembryonen sowie der mit den Neonicotinoiden exponierten Embryonen aufgenommen, wobei die Embryonen in eine Petrischale mit Agarose und 1 % Methylcelluloselösung überführt wurden.

2.2.2.2 Quantitative Ausmessung von Embryonen von *X. laevis* mittels Fiji/ImageJ64

Die in Stadium 45 fotografierten Embryonen wurden mit dem Computerprogramm Fiji/ImageJ64 ausgemessen. Zum einen wurde die Körperlänge quantifiziert, indem diese vom Kopf entlang des Rückenmarks bis zur Schwanzspitze gemessen wurde (Abb. 7A). Zum anderen wurde die Augenfläche durch Umranden der Augen ausgemessen, um anschließend den Mittelwert der von beiden Augen gemessenen Fläche eines Embryos zu bilden (Abb. 7B). Zudem wurde die Kopffläche durch Umranden des Kopfes und die Kopfbreite durch Messen der breitesten Stelle auf Höhe der Augen ermittelt (Abb. 7C). Die gemessen Werte wurden in Pixel angegeben und in Millimeter bzw. Quadratmillimeter umgerechnet. 1 Pixel entspricht bei 1-facher Vergrößerung 180 mm.

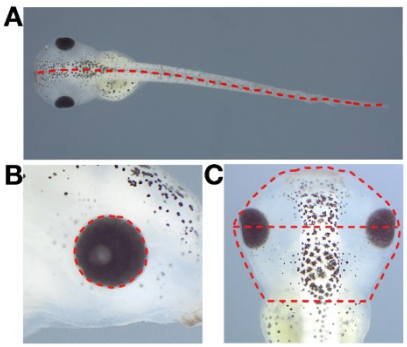

Abbildung 7: Visualisierung der quantitativen Analyse mittels Fiji/ImageJ. A *Messung der Körperlänge vom Kopf bis zur Schwanzspitze entlang des Rückenmarks mittels eines Linien-Tools.* ***B*** *Berechnung der mittleren Augenfläche durch Umranden des Auges bei lateral aufgenommenen Embryonen.* ***C*** *Quantifizierung der Kopfbreite durch Ziehen einer geraden Linie mittig durch die Augen bei dorsal fotografierten Embryonen.*

2.2.3 Auswertung von den Organen

2.2.3.1 Herz- und Gehirnisolierung und quantitative Ausmessung

Für die Herz- und Gehirnisolierungen wurden Embryonen verwendet, die in Stadium 45 mit 1x MEMFAT fixiert worden sind. Zur Isolierung der Herzen und Gehirne wurden die Embryonen in 1x TBST umgepuffert. Vor Isolierung der Herzen und Gehirne wurden die Embryonen wie in 2.2.2.1 beschrieben fotografiert und einzeln in 24-Well-Platten überführt, um die isolierten Herzen und Gehirne später den Embryonen zuordnen zu können. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe von Pinzetten. Anschließend wurden die Herzen und Gehirne in einer Petrischale mit 1 % Methylcellulose unter dem Olympus Mikroskop fotografiert. . Hierfür wurde beide Organe standardisiert hingelegt. Die Herzen wurden in ventraler Ansicht aufgenommen, wobei der Ausflusstrakt zentral lag. Die Gehirne wurden symmetrisch ausgerichtet und von dorsal aufgenommen. Anschließend wurden beide Organe mit Fiji/ImageJ64 ausgemessen. Dabei wurde bei den Gehirnen durch Umrandung die Fläche und bei den Herzen die Atrium-, Ventrikelbreite, sowie die Gesamtlänge gemessen. Mit GraphPad Prism 9 wurden aus den gemessenen Werten Statistiken erstellt.

2.2.3.2 Knorpelisolierung aus X. Embryonen

Zur Isolierung der Knorpel wurden Embryonen in Stadium 45/46 mit 1x MEMFAT fixiert und mit Alcianblau nach Gessert et al., 2007 gefärbt. Hierzu wurden die Embryonen in Glasgefäßen mit 4 ml 1 %iger Alcianblau-Färbelösung für 95 min bei RT auf einem Rollmischer inkubiert. Mit einer Lösung aus 80 % EtOH und 20 % Eisessig wurde anschließend zweimal je 1 h und über Nacht gewaschen. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen in 1x PBS überführt, nachdem sie für 3 h in 30 % H_2O_2 gebleicht wurden. Gelagert wurden die Embryonen bei 4 °C. Zur Isolierung der Knorpel wurden die Embryonen in eine Petrischale mit 1x PBS, überführt, woraufhin die Knorpel mithilfe von zwei Pinzetten isoliert wurden. Danach wurden die isolierten Knorpel in dorsaler Ansicht, symmetrisch ausgerichtet, in einer mit 1x TBST gefüllten Petrischale mit dem Mikroskop MVX10 fotografiert.

2.2.3.3 Antikörperfärbung der Hirnnerven und Herzen von X. Embryonen

Die hierfür verwendeten Embryonen wurden in Stadium 45/46 mit 1x MEMPFA fixiert. Zu Beginn der Immunfärbung wurden die Embryonen fünfmal mit 1x PBS für je 5 min rollernd gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal mit 1x PBS + 0,3 % Triton X-100 auf dem Rollermixer für 30 min permeabilisiert, um daraufhin in einer Lösung aus 1 ml 1x PBS + 3 % Horse Serum für 3 h bei Raumtemperatur blockiert zu werden. Danach wurden sie mit 500 µl der Antikörperlösung (100 µl primärer Antikörper in 2 ml 1x PBS + 3 % Horse Serum) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Zur Antikörperfärbung der Nerven wurde der primäre Antikörper 3A10 (1:20) verwendet, zur Färbung der Herzen der Antikörper Cardiac Troponin T CT 3 (1:20). Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen sechsmal für je 30 min mit 1x PBS auf dem Rollermixer gewaschen. Nachdem die Embryonen mit 1x PBS + 20 % Horse Serum für 1 h bei Raumtemperatur blockiert wurden, wurden sie in 500 µl Lösung (20 µl sekundärer

Antikörper (Anti-Digoxygenin) in 2 ml 1x PBS + 20 % Horse Serum) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da der Antikörper lichtempfindlich ist, wurden die Embryonen von nun an im Dunkeln gehalten. Am nächsten Tag wurden die Embryonen fünfmal für je 30 min bei Raumtemperatur rollernd gewaschen. Direkt nach dem letzten Waschgang wurden sie mit dem Olympus Fluoreszenz Mikroskop mit einem Cy3 Filter in ventraler Ansicht fotografiert, wobei die Embryonen symmetrisch ausgerichtet waren.

Zur Bestimmung der Länge von gut erkennbaren Hirnnerven, wie dem *N. opticus, N. trigeminus, N. mandbularis, N. glossopharyngeus* und *N. hypoglossus* wurden diese nach der 3A10-Antikörperfärbung mit Fiji/ImageJ64 wie in 2.2.2.2 gemessen und mit GraphPad Prism 9 Statistiken erstellt.

Zur Beurteilung der mit CT3 gefärbten Herzen, wurden diese bezüglich ihrer Größe mit Fiji/ImageJ64 optisch verglichen und mit GraphPad Prism 9 eine Statistik erstellt.

2.2.3.4 Herzfrequenzmessung in X. Embryonen

Zur Messung der Herzfrequenz wurden die Embryonen mit Flupyradifuron beziehungsweise Thiamethoxam bis zu Stadium 45 inkubiert. Vor der Messung wurden sie für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde je ein Wildtyp-Embryo bzw. ein mit 0,1, 1, 10, 50 oder 100 mg/l Thiamethoxam oder Flupyradifuron behandelter Embryo in eine 6-Well-Platte überführt, die mit 0,1x MBSH gefüllt war. Zur Messung der Herzfrequenz wurden nun mit Hilfe eines Mikroskops für eine Minute mit einem Zähler die Herzschläge für je 1 min gemessen. Um die mögliche Veränderung der Herzfrequenz während des Versuchs durch Alterung der Embryonen zu kompensieren, wurden die mit verschiedenen Konzentrationen behandelten Embryonen abwechselnd gemessen.

2.2.4 Messung der Mobilität der *X.* Embryonen

Zur Bestimmung der Mobilität der Wildtyp- und der mit Thiamethoxam bzw. Flupyradifuron behandelten Embryonen (1, 10, 100 mg/l) wurden diese für 2 h mit der Software EthoVisionXT und der Kamera Basler acA1300-30gc aufgezeichnet. Zuvor wurden sie für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu wurden die Embryonen wie in 2.2.1.2 bis zu Stadium 45 inkubiert. Zur Einstellung der Schärfe und Helligkeit mit der Software Pylon viewer (64x) wurden zunächst vier Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,2 cm mit 0,1x MBSH gefüllt und ein Embryo in eine dieser vier Petrischalen überführt. Anschließend wurden folgende Einstellungen der Software EthoVisionXT vorgenommen:

- Quelle: Live-Tracking unter Verwendung der Kamera acA1300-30gc von Basler
- Objekt: Fische, Zebrafischlarven
- Arena: offenes Feld, rund
- Objektnummer: 3, Mittelpunkt: das Tier ist dunkler als der Hintergrund
- Abtastrate: 25 Samples/Sekunde
- Experimentelle Einstellungen: Auflösung: 1280 x 960
- Arena- Einstellungen: Bild von der Kamera aufnehmen, Arena für eine Petrischale einstellen und Kalibrierung mit dem Durchmesser einer kleinen Petrischale (Durchmesser 3,2 cm)
- Erfassung: nur Video speichern, später verfolgen

Der für die Einstellungen verwendete Embryo wurde anschließend in die 6-Well-Platte zurück pipettiert. In jede Petrischale wurden drei Embryonen überführt und gleichzeitig bei etwa 27 °C gefilmt. Insgesamt wurden an einem Tag neun Embryonen pro Konzentration gefilmt. Die Bewegung wurde mit der Software EthovisionXT13 aufgezeichnet. Dabei wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

- Einstellungen für die Versuchssteuerungen: Start nach 2 s, Stopp nach 2 h

- Einstellungen zur Erkennung: Anpassung der Grauskala für jedes Video zur Definition der einzelnen Embryonen. Zur Kontrolle der Einstellungen wurden Ausschnitte des Videos betrachtet.

Zur Analyse der Mobilität wurden folgende Parameter verwendet:

- Spurglättungsprofile: kein Filter, minimale Bewegungsdistanz, direkt 1 cm
- Gesamtbewegungsstrecke in cm

Embryonen, die in dem vorgegebenen Zeitraum über 10 % der Zeit nicht von der Software erkannt worden sind, wurden nicht in die Statistik aufgenommen.

2.2.5 Whole mount in situ Hybridisierung

2.2.5.1 Generierung von WMISH Sonden

Die für eine Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) notwendigen Sonden *isl1, nkx2.5 und sox3* wurden selbst generiert, während die anderen verwendeten Sonden bereitgestellt waren. Die Linearisierung erfolgte durch Zugabe von 5 µg DNA, 2 µl 10x Puffer, 2 µl Restriktionsenzym und wurde anschließend auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit ddH_2O aufgefüllt und für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung einer vollständigen Linearisierung des Plasmids wurde ein Kontrollgel angefertigt. Dazu wurden 3 µl ddH_2O, 1 µl 10x Ladepuffer und 1 µl der Probe auf eine Titerplatte gegeben und auf das Kontrollgel aufgetragen. Den für die Linearisierung notwendigen 1%igen Agarosegelen wurden zuvor 2 µl Midori Green hinzugefügt, damit die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar werden. Das Gel wurde mit 1x TBE-Puffer bedeckt und aus den zu prüfenden Proben wurden Aliquots erstellt. Dazu wurden zu 1 µl Probe, 3 µl DEPC-H_20 und 1 µl RNase freier Ladepuffer bzw. 10x Ladepuffer gegeben. Die Gelkammern wurden mit 5 µl dieser Lösung gefüllt. Zur Kontrolle wurde ein Marker aufgetragen. Für 15-20 min wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt. Anschließend erfolgte die Auswertung des Agarosegels mithilfe des Geldokumentationsgeräts.

Anschließend wurde die linearisierte Probe mit QlAquik PCR Purifikation Kit aufgereinigt. Hierzu wurde PB Puffer in einem Verhältnis von 5:1 zu dem Linearisierungsansatz hinzugegeben und gemischt. Eine QlAquick Säule wurde dann in ein 2 ml Sammelröhrchen gesetzt. Anschließend wurde die Probe auf diese Säule gegeben und für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Hierbei wurde die DNA an die Säule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut für 60 s bei 13000 rpm trocken zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen gesetzt und zum Ablösen der DNA mit 30 µl DEPC-H_2O eluiert. Nachdem die Säule für 1 min stehend inkubiert wurde, wurde sie erneut bei 13000 rpm 60 s zentrifugiert. Die Säule wurde nun verworfen und es verblieben 30 µl aufgereinigte DNA.

Zum Abschätzen der DNA-Menge, welche man für die folgende Transkription benötigt, wurde erneut ein Kontrollgel angefertigt. Zur Transkription wurde 1 µg linerarisierte DNA, 2 µl 10x RNA Labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptions-Puffer, 1 µl RNA-Polymerase, 1µl RNase Out und x µl DEPC-H_2O (Freivolumen: 14 µl) vermischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert, um anschließend nach Zugabe von 2 µl DNase RNase frei nochmal für 15 min bei 37 °C inkubiert zu werden. Zur Überprüfung der Transkription wurde ein Kontrollgel durchgeführt.

Zur Aufreinigung mit einer G50 Säule wurde diese zuerst ohne Probe für 1 min bei 2900 RPM zentrifugiert, bevor dann die Probe auf die Schrägfläche der Säule pipettiert und für 2 min bei 2900 RPM in ein neues 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen zentrifugiert wurde. Erneut wurde mit 1 µl der Probe ein Kontrollgel angefertigt. Die Intensität der Bande des Kontrollgels zeigte die Menge der enthaltenen RNA an.

Der restlichen Probe wurde zuletzt 2 ml Hybridisierungspuffer zugegeben und die Probe bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Whole mount in situ Hybridisierung (WMISH)

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene, die an der Augen-, Herz- und Neuralleistenzellenentwicklung beteiligt sind, wurde eine Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) durchgeführt.

Dafür wurden genspezifische RNA-*antisense* Sonden mit dem Steroid Digoxigenin markiert, die durch Behandlung mit Anti-Digoxygenin Antikörpern, die mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt sind, eine Farbreaktion hervorrufen. Dadurch kann visuell analysiert werden, wo und mit welcher Intensität die Gene im Embryo exprimiert werden. Es wurde die Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Expression verschiedener Somitenmarker (*actc1*), Augenmarker (*rax, pax6*), Neuralleistenmarker (*egr2, twist*), Plakodenmarker (*sox3, n4bp3, alcam*) sowie Herzmarker (isl1, *nkx2.5, actc1, mhc*α) untersucht.

Die Wildtyp-Embryonen und die mit 100 mg/l Flupyradifuron behandelten Embryonen wurden je nach Marker in verschiedenen Stadien mit 1x MEMFAT fixiert. Am ersten Tag der WMISH wurden die Embryonen für 10 min bei Raumtemperatur in 1 ml 0,1 M Triethanolamin inkubiert, nachdem sie über Nacht in 1x TBST bei 4 °C inkubiert worden sind. Dem Triethanolamin wurden zweimal 2,5 µl Essigsäureanhydrid hinzugefügt und für je 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen zweimal in 1x TBST für je 5 min gewaschen. Mit 300 µl 1x MEMFAT wurden die Embryonen fixiert und dann für 5 bzw. 10 min rollernd mit 1x TBST gewaschen. Daraufhin wurden die Embryonen in 300 µl Hybridisierungspuffer umgepuffert und bei 65 °C für 4 h inkubiert. Die Inkubationsschritte bei 65 °C wurden im Wasserbad durchgeführt. Zur Denaturierung der RNA-Sonden und Erzeugung von einzelsträngiger RNA wurden diese für 5 min bei 95 °C inkubiert, um anschließend die Embryonen mit je 500 µl der RNA-Sonde über Nacht im Wasserbad zu inkubieren.

Am darauffolgenden Tag wurden die Sonden abgenommen, diese werden 12-15-mal verwendet und bei -20 °C gelagert. Die Embryonen wurden für 15 min mit 300 µl vorgewärmten Hybridisierungspuffer bei 65 °C inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurden 900 µl vorgewärmtes 2x SSC hinzugegeben und für 30 min bei 65 °C gewaschen.

Anschließend wurden die Embryonen in 1 ml 2x SSC + 0,05 % Tween + 20 µg RNaseA + 10 U/ml RNaseT1 für 40 min bei 37 °C und danach für 15 min in 900 µl vorgewärmtem 2x SSC + 0,05 % Tween bei 65 °C inkubiert. Diese Lösung wurde daraufhin abgenommen und 900 µl vorgewärmtes 0,2x SSC + 0,5 % Tween für 30 min bei 65 °C hinzugegeben. Die Embryonen wurden zweimal für je 10 min auf dem Roller mit 1x TBST gewaschen und anschließend mit 500 µl Blocking-Solution (1 ml 5x MAB/10 % BMB Stammlösung + 25 µl 10 % Tween + 600 µl Horse Serum auf 5 ml DEPC- H_2O) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde 1 µl Anti-Digoxygenin-Antikörper in die übrig verbliebene Blockingsolution von 10 ml gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur rollernd gemischt. Nach einer Stunde wurde die Blockingsolution von den Embryonen entfernt, 500 µl der Antikörperlösung zugegeben, die Embryonen bei Raumtemperatur für 2,5 h inkubiert und über Nacht bei 4 °C in 4 ml 1x TBST gelagert.

Am dritten Tag der WMISH wurden die Embryonen zweimal für 45 min und einmal für 60 min mit je 4 ml 1x TBST rollernd gewaschen, um anschließend in eine 24-Well-Platte überführt und in 1 ml AP-Puffer für 10 min inkubiert zu werden. Die Embryonen wurden je nach Marker über Nacht bzw. 4 Tage (n4bp3) bei RT mit 500 µl BM Purple AP Substrat gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 1x MEMFAT gestoppt und die Embryonen bei 4 °C gelagert. Vor Auswertung der Embryonen wurden sie für 2 - 3 h mit 500 µl 30 % H_2O_2 gebleicht, in 1x TBST überführt und anschließend mit dem Olympus-Mikroskop fotografiert.

2.2.5.3 WMISH-Auswertung von BM Purple gefärbten Embryonen

Die gefärbten Embryonen wurden symmetrisch unter dem Mikroskop ausgerichtet und hinsichtlich Veränderung der Fläche und Intensität ausgewertet. Zudem wurden exemplarische Fotos zur Erstellung der Abbildungen aufgenommen. Dazu wurde Fiji/ImageJ64 verwendet und folgende Einstellungen vorgenommen:

- Abstand in Pixel: 2588

- Bekannte Distanz: 7
- Pixel-Seitenverhältnis: 1
- Einheit der Länge: mm
- Einstellungen zur Bildanalyse: Auswahl von Fläche, mittlerer Grauwert, min. und max. Grauwert, Grenzwert bis Schwellenwert, Display anzeigen

Anschließend wurde die auszuwertende Region am ausgewählten Embryo umrandet und ausgeschnitten, um dann die Intensität der Grauwerte zu analysieren.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Thiamethoxam auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis*

3.1.1 Mortalitätsrate von Thiamethoxam auf die Embryonen von *X. laevis*

Zunächst wurde die Mortalitätsrate aller unabhängigen Versuche ausgewertet. Wie in Abb. 8 dargestellt, zeigte keine der verwendeten Konzentrationen von 0,1 bis 100 mg/l Thiamethoxam eine signifikante Steigerung der Mortalität (Abb. 5)

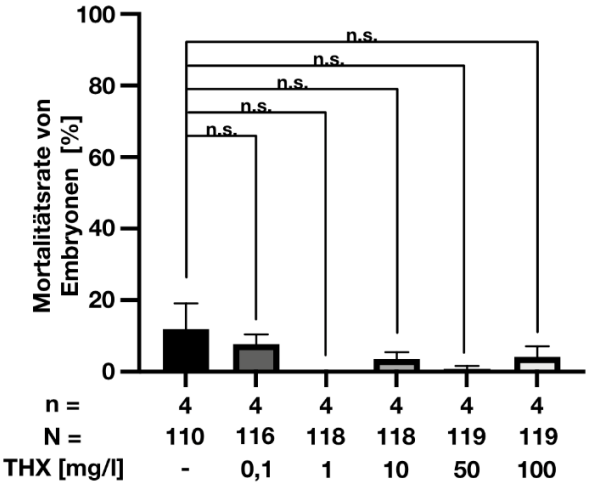

Abbildung 8: Statistische Angaben zur Mortalitätsrate von Wildtyp- und Thiamethoxam behandelten Embryonen in Prozent. *Es ist keine signifikante Steigerung der Mortalitätsrate nach Inkubation der Embryonen mit Flupyradifuron in vier unabhängigen Experimenten zu erkennen. Die Embryonen wurden mit 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l Thiamethoxam-Lösungen behandelt und wurden vor der Auswertung bis zum Stadium 45 inkubiert. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts an (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p<0,05.*

3.1.2 Einfluss von Thiamethoxam auf den generellen Phänotyp der Embryonen von *X. laevis*

Aufgrund von beobachteten Auffälligkeiten bezüglich des Phänotyps bei den mit Thiamethoxam behandelten Embryonen während der Auswertung der Mortalität wurde durch Zuhilfenahme des Mikroskops der Einfluss auf den Phänotyp untersucht. Hier

zeigte sich, dass die mit Thiamethoxam exponierten Embryonen im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen signifikant veränderte Körperlängen aufwiesen (Abb. 9). Die quantitative Analyse bestätigte dies bei den Konzentrationen 1, 50 und 100 mg/l. Die Embryonen wurden bei diesen Konzentrationen signifikant länger.

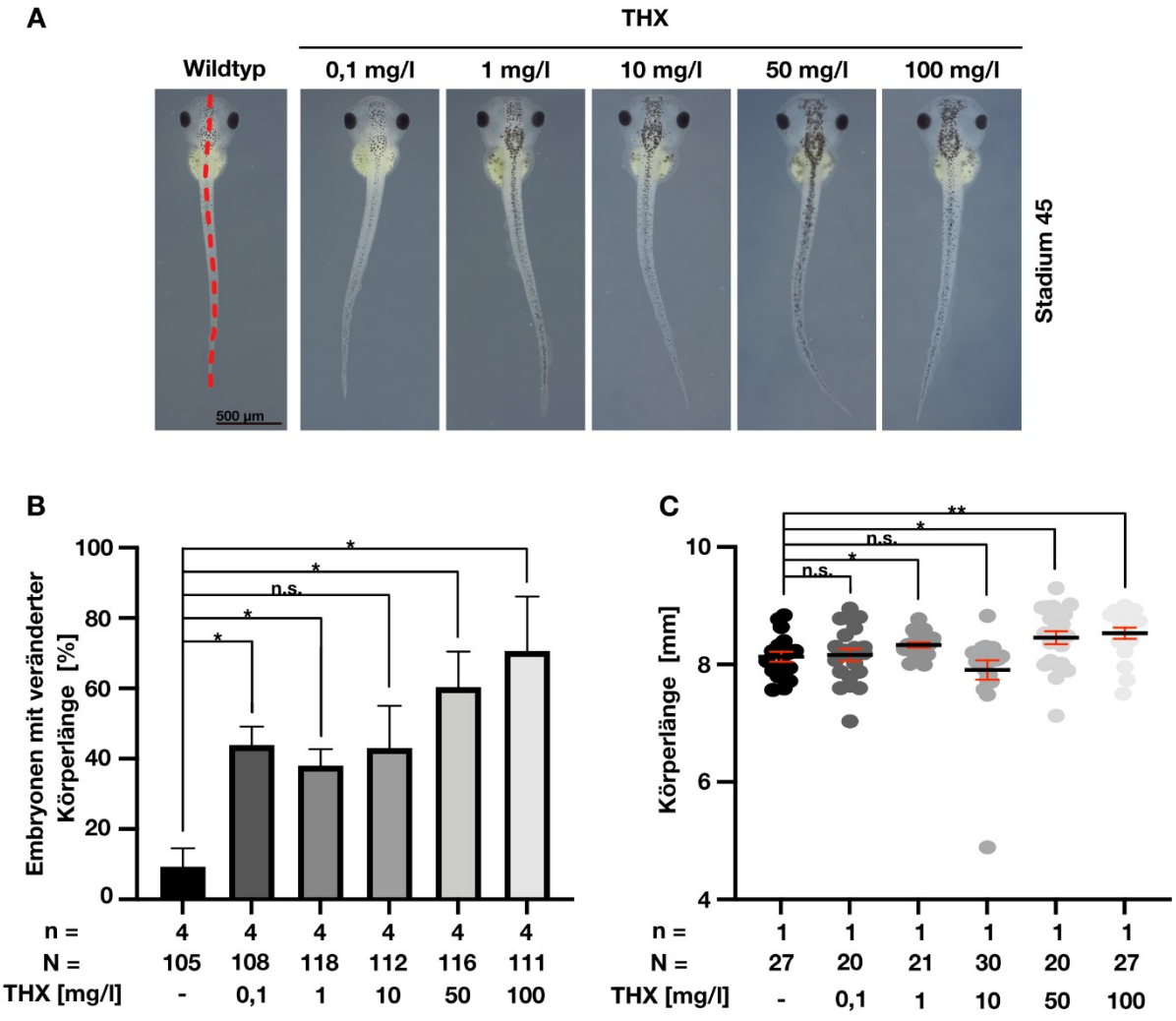

Abbildung 9: Veränderungen der Körperlänge unter Thiamethoxam Behandlung. ***A:*** *Dorsalansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1, 10, 50, 100 mg/l) Thiamethoxam (THX) inkubierten Embryonen in Stadium 45. Die segmentierte rote Linie zeigt die quantitative Ausmessung der Körperlänge mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der Embryonen mit veränderter Körperlänge von vier unabhängigen Versuchen nach Behandlung der Embryonen mit Thiamethoxam. Eine Veränderung konnte nach Inkubation mit 0,1, 1, 50 und 100 mg/l beobachtet werden.* ***C:*** *Quantitative Bestimmung der Körperlänge eines repräsentativen Versuchs mittels Fiji/ImageJ64. Die Inkubation mit 1, 50 und 100 mg/l führte zu Vergrößerung der Körperlänge. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01.*

Neben der veränderten Körperlänge zeigten die mit Thiamethoxam behandelten Embryonen eine signifikante Vergrößerung der Kopfbreite nach Inkubation mit allen Konzentrationen (Abb. 10). Die Ausmessung von Kopfbreite und -fläche von *Xenopus* Embryonen eines repräsentativen Experiments bestätige eine signifikante Vergrößerung nach Behandlung mit hohen Thiamethoxam Konzentrationen (50 und 100 mg/l) im Vergleich zu den unbehandelten Embryonen (Abb. 10C, D).

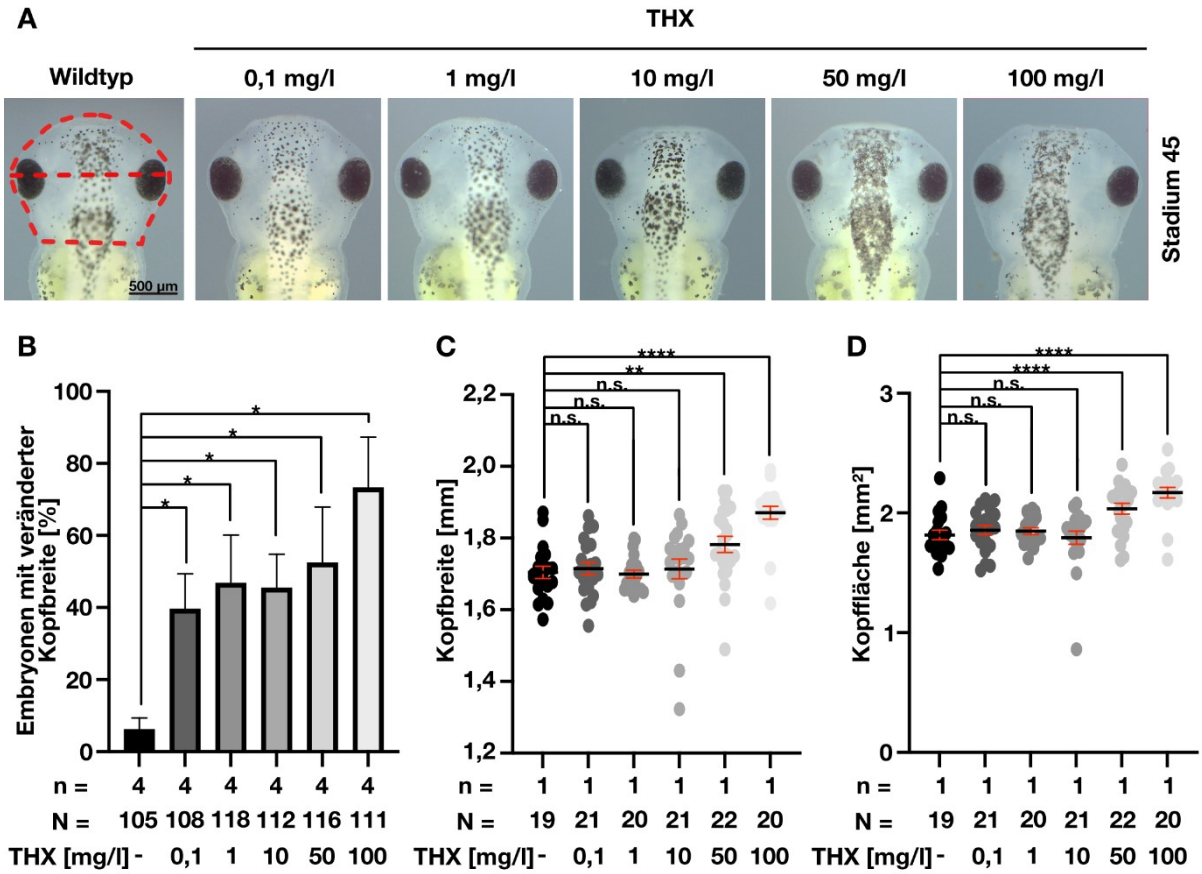

Abbildung 10: Vergrößerung des Kopfes bei mit Thiamethoxam behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Dorsalansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1, 10, 50, 100 mg/l) Thiamethoxam (THX) behandelte Embryonen in Stadium 45. Die Messung der Kopfbreite und Kopffläche erfolgte durch die rot segmentierte Linie bzw. den rot segmentierten Kreis mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Prozentsatz der mit Thiamethoxam behandelten Embryonen mit veränderter Kopfbreite von vier unabhängigen Versuchen.* ***C:*** *Quantitative Ausmessung der Kopfbreite von mit Thiamethoxam behandelten Embryonen eines repräsentativen Versuchs mittels Fiji/ImageJ64. Die Inkubation mit 50 und 100 mg/l führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Kopfbreite.* ***D:*** *Quantitative Ausmessung der Kopffläche von mit Thiamethoxam behandelten Embryonen eines repräsentativen Versuchs mittels Fiji/ImageJ64. Die Behandlung führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Kopffläche bei einer Konzentration von 50 und 100 mg/l. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01; ****≤0,0001.*

Im Anschluss an die Auswertung des Kopfes wurden die Augen analysiert. Nach Inkubation der Embryonen mit Thiamethoxam konnte bei allen Konzentrationen (0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l) in Stadium 45 eine Veränderung der Augenfläche festgestellt werden (Abb. 11). Die quantitative Ausmessung der Augenflächen zeigte jedoch keine signifikante Veränderung (Abb. 11C).

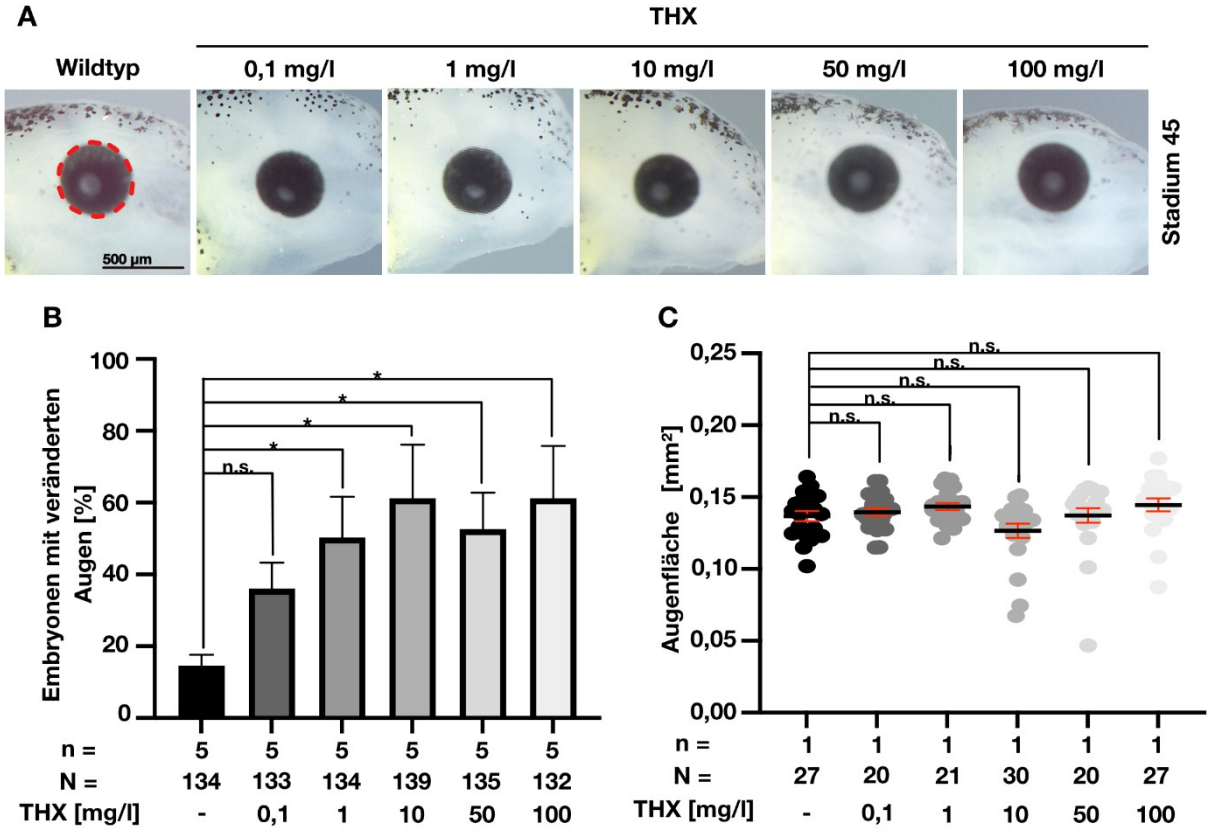

Abbildung 11: Auswirkungen von Thiamethoxam auf die Entwicklung der Augen von X. laevis. A: *Lateralansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 ,1 ,10 ,50 ,100 mg/l) Thiamethoxam (THX) behandelte Embryonen in Stadium 45. Die Messung der Augenfläche erfolgte durch den rot segmentierten Kreis mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Prozentsatz der mit Thiamethoxam inkubierten Embryonen mit veränderten Augen in Stadium 45 von fünf unabhängigen Versuchen.* ***C:*** *Quantitative Auswertung der Augenfläche von mit Thiamethoxam behandelten Embryonen eines repräsentativen Versuchs mittels Fijji/ImageJ64. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05.*

Die Auswertung des äußeren Phänotyps zeigten signifikante Veränderungen der embryonalen Entwicklung von *X. laevis* durch die Behandlung mit Thiamethoxam. Zur Beurteilung der Auswirkungen hinsichtlich physiologischer Vorgänge wurde die

Mobilität und die Auswirkung auf das Herz durch Messung der Herzfrequenz untersucht.

Nach Aufnahme der Embryonen mit einer Kamera wurde nach 2 h die Mobilität anhand der Gesamtdistanz und der Durchschnittsgeschwindigkeit analysiert. Die mit 1 und 10 mg/l Thiamethoxam behandelten Embryonen zeigten eine Tendenz zur Verringerung bei beiden Parametern. Bei 100 mg/l war sowohl die Gesamtdistanz als auch die Durchschnittsgeschwindigkeit signifikant gesteigert (Abb. 12).

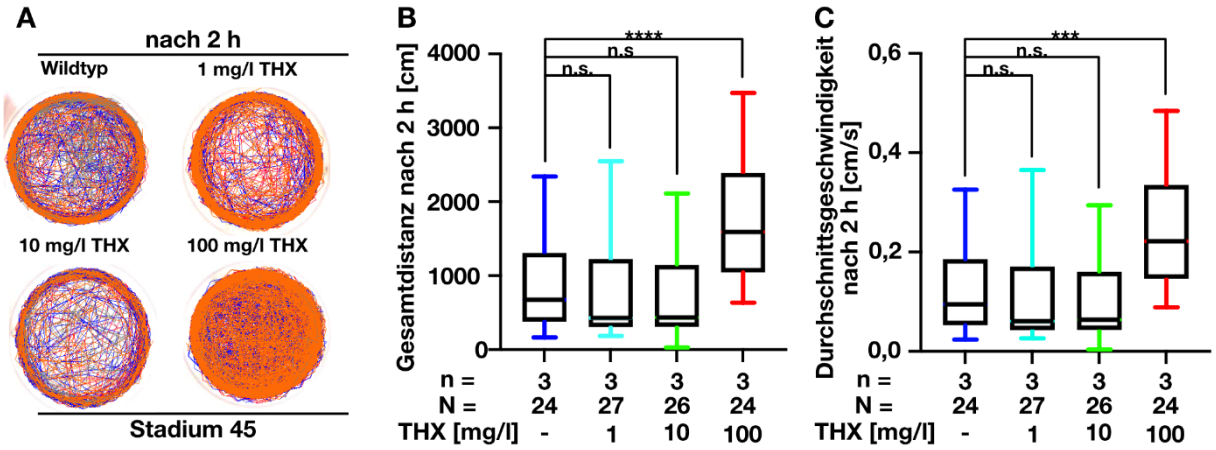

Abbildung 12: Auswirkungen auf die Mobilität von Thiamethoxam auf die Embryonen von X. laevis. A: *Repräsentative Bilder der Mobilität von Embryonen nach Inkubation mit 1, 10 und 100 mg/l Thiamethoxam (THX) sowie den unbehandelten Embryonen (die Farben orange, rot und blau entsprechen je einem Embryo; grau: Objekt nicht gefunden).* ***B:*** *Auswertung der zurückgelegten Distanz der Embryonen nach 2 h von drei unabhängigen Versuchen. Die Distanz verringerte sich nach Inkubation mit 1 und 10 mg/l. Eine signifikante Steigerung der Distanz zeigte sich bei den mit 100 mg/l Thiamethoxam inkubierten Embryonen.* ***C:*** *Auswertung der Durchschnittsgeschwindigkeit der Embryonen nach 2 h. Nach Inkubation mit 1 und 10 mg/l verringerte sich die Geschwindigkeit. Die mit 100 mg/l Thiamethoxam behandelten Embryonen zeigten eine signifikante Steigerung der Durchschnittsgeschwindigkeit. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; ***p≤0,001; ****≤0,0001.*

Die Herzfrequenz der Embryonen von *X. laevis* in Stadium 45, die mit Thiamethoxam behandelt wurden, zeigten nach Inkubation mit 10 mg/l bzw. 100 mg/l eine signifikante Steigerung (Abb. 13).

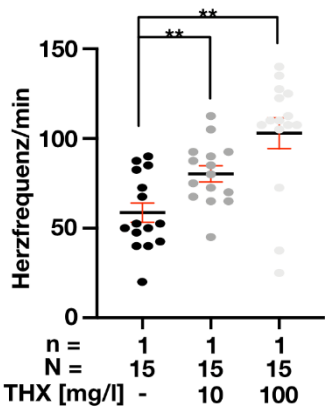

Abbildung 13: Steigerung der Herzfrequenz der Embryonen von X. laevis durch Thiamethoxam. *Herzfrequenz der Embryonen, die mit 10 und 100 mg/l Thiamethoxam (THX) inkubiert wurden sowie der Kontrollgruppe. Die Herzfrequenz wurde 1 min lang gezählt. Es wurde nach Inkubation mit 10 und 100 mg/l eine signifikante Steigerung der Herzfrequenz beobachtet. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, **p≤0,01.*

3.2 Einfluss von Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis*

3.2.1 Mortalitätsrate von Flupyradifuron auf die Embryonen von *X. laevis*

Wie bei Untersuchung der Auswirkung von Thiamethoxam auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* wurden zunächst die Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Mortalität ausgewertet.

Bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Mortalität nach Inkubation mit allen Konzentrationen (0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l) (Abb. 14).

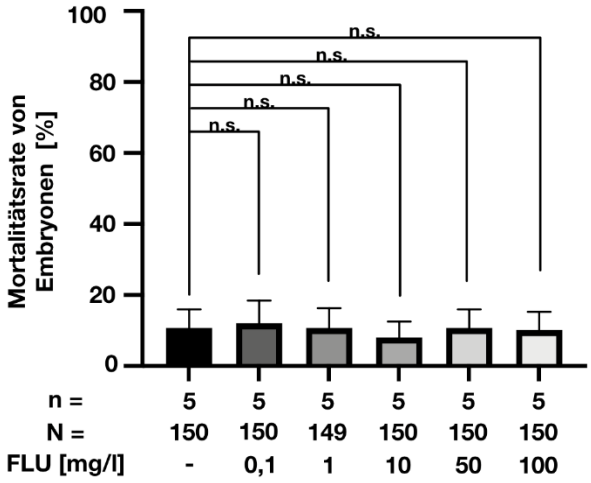

Abbildung 14: Statistische Angaben zur Mortalitätsrate von Wildtyp- und Flupyradifuron behandelten Embryonen in Prozent. *Keine signifikante Steigerung der Mortalitätsrate der Embryonen nach Inkubation mit Flupyradifuron (FLU) bei fünf unabhängigen Versuchen. Die Embryonen wurden mit 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l Flupyradifuron bis zum Stadium 45 inkubiert. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Aufgrund von beobachteten Auffälligkeiten, wie eine Verkleinerung der Augen, , wurde im Folgenden der Einfluss von Flupyradifuron auf Embryonen von *X. laevis* hinsichtlich des generellen Phänotyp und der Mobilität von *X. laevis* beurteilt.

3.2.2 Auswirkungen von Flupyradifuron auf den generellen Phänotyp der Embryonen

Die Auswertung der Körperlänge der mit Flupyradifuron behandelten Embryonen durch Zuhilfenahme eines Mikroskops zeigte eine signifikante Veränderung nach Inkubation mit Konzentrationen ab 1 mg/l. Die quantitative Ausmessung eines repräsentativen Experiments ergab eine signifikante Verkleinerung der Körperlänge nach Behandlung der Embryonen mit 10 mg/l Flupyradifuron (Abb. 15).

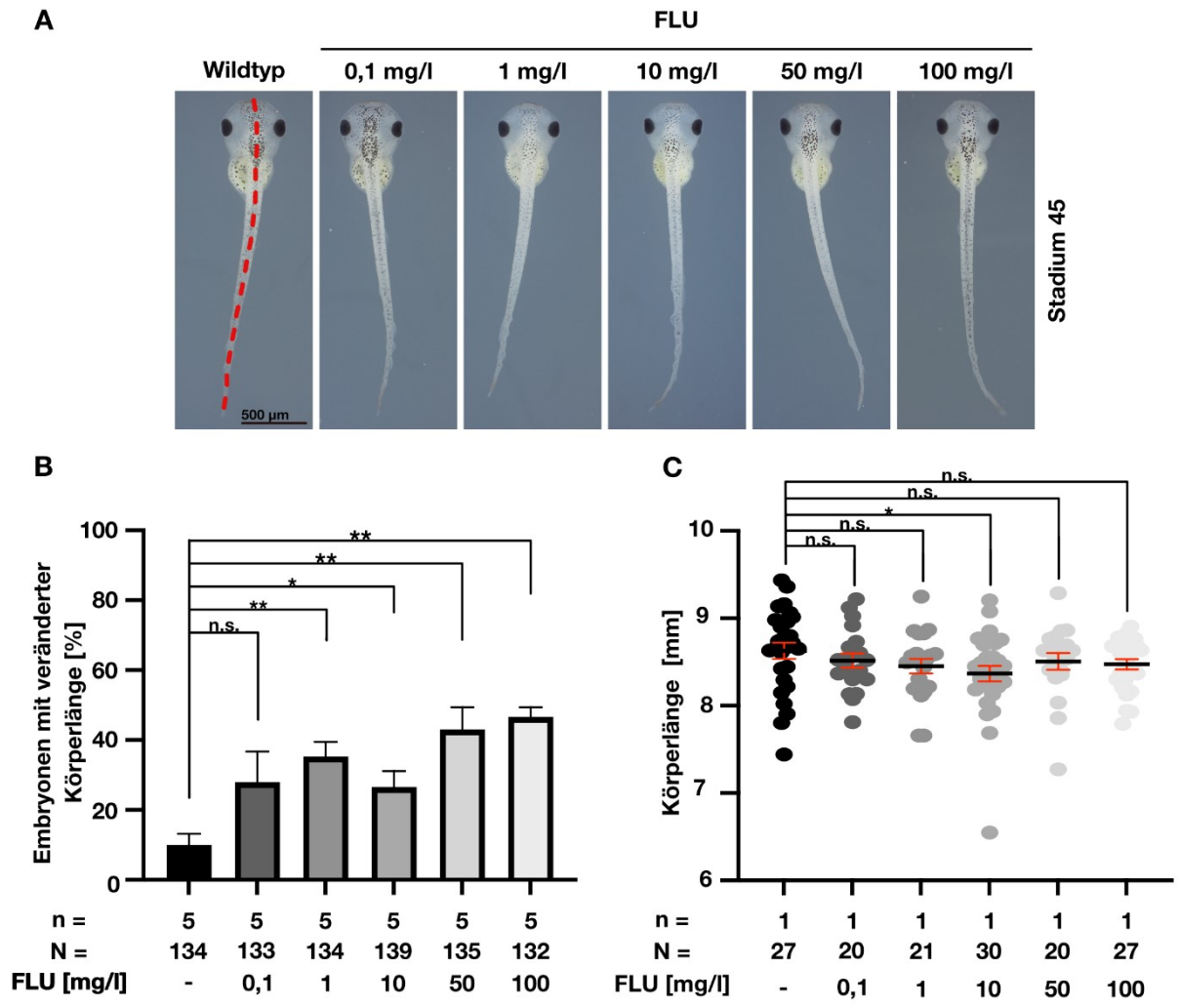

Abbildung 15: Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Körperlänge. ***A:*** *Dorsalansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 ,1 ,10 ,50 ,100 mg/l) Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen in Stadium 45. Die segmentierte rote Linie zeigt die quantitative Ausmessung der Körperlänge mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Signifikante Veränderung der Körperlänge bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von fünf abhängigen Versuchen ab einer Konzentration von 1 mg/l.* ***C:*** *Statistische Analyse der quantitativen Ausmessung mit Fiji/ImageJ64 eines repräsentativen Versuchs. Die Ausmessung ergab eine signifikante Verkleinerung der Körperlänge bei einer Konzentration von 100 mg/l. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01.*

3.2.3 Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Mobilität der Embryonen

Zur Analyse der Mobilität der mit Flupyradifuron behandelten Embryonen wurden folgende Paramter analysiert: Gesamtdistanz und Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 16). Nach 2 h zeigten die mit Flupyradifuron behandelten Embryonen nach Inkubation mit 1 und 10 mg/l eine Verminderung der Gesamtdistanz. Bei 100 mg/l zeigte sich eine

signifikante Verringerung der Distanz. Bei Beurteilung der Geschwindigkeit zeigte sich ebenfalls eine Erniedrigung bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen nach Inkubation mit allen Konzentrationen. Bei 100 mg/l war die Durchschnittsgeschwindigkeit signifikant reduziert (Abb. 16C).

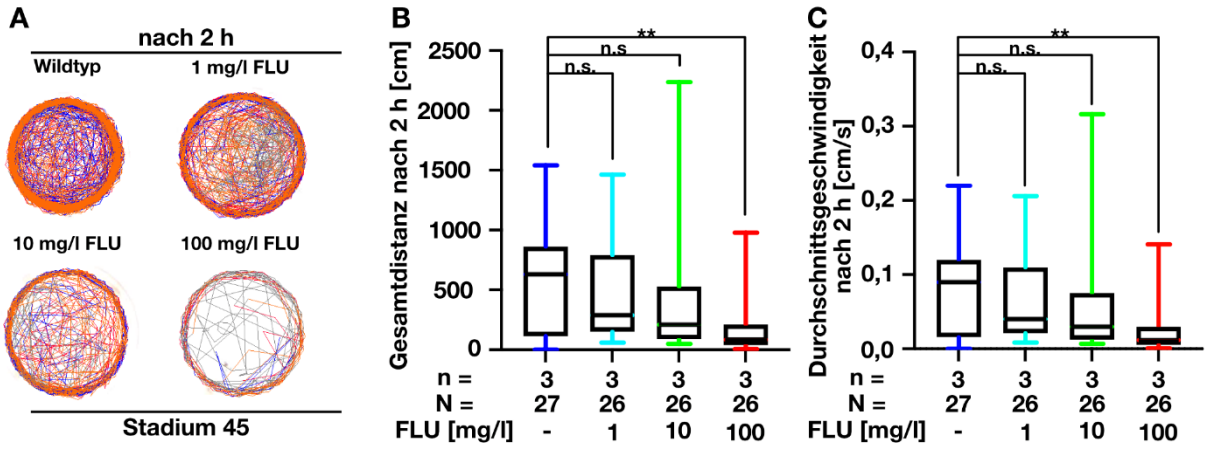

Abbildung 16: Reduzierung der Mobilität bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Repräsentative Bilder der Mobilität der mit 1, 10 und 100 mg/l Flupyradifuron (FLU) behandelten Embryonen sowie den unbehandelten Embryonen (die Farben orange, rot und blau entsprechen je einen Embryo; grau: Objekt nicht gefunden).* ***B:*** *Bei Inkubation mit 1, 10 und 100 mg/l zeigte sich eine Verringerung der Gesamtdistanz nach Auswertung der zurückgelegten Distanz der Embryonen von drei unabhängigen Versuchen nach 2 h. Nach Inkubation mit 100 mg/l zeigte sich eine signifikante Verringerung.* ***C:*** *Bei allen Konzentrationen (1, 10, und 100 mg/l) zeigte sich eine Verkleinerung der Durchschnittsgeschwindigkeit, nach Inkubation mit 100 mg/l eine signifikante Verkleinerung. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Die Balkendiagramme zeigt den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; **p≤0,01.*

Aufgrund der Auswirkungen, die sich bei Auswertung der Mobilität zeigten, wurde im Anschluss eine Markergenanalyse von *actc1* durchgeführt, um beurteilen zu können, ob die physiologischen Auffälligkeiten ihre Ursache in veränderten Somiten haben. Bei den mit 100 mg/l Flupyradifuron inkubierten Embryonen in Stadium 28 konnten keine Veränderungen der Expression des Markergens *actc1* in den Somiten nachgewiesen werden (Abb. 17).

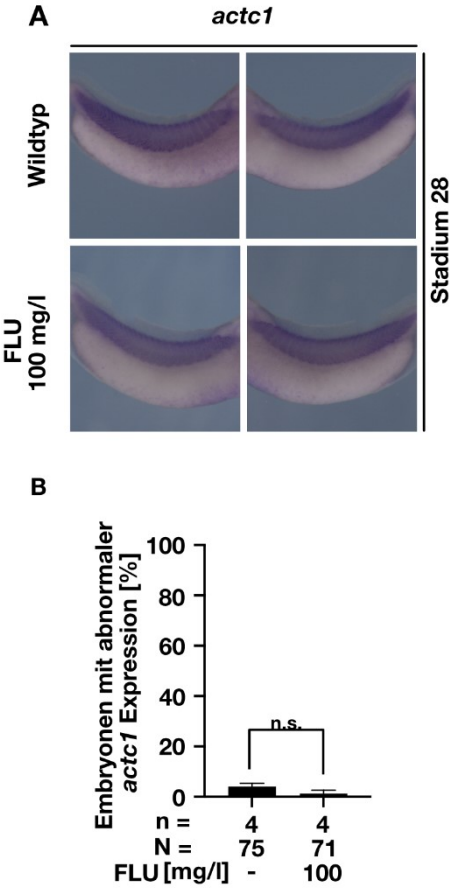

Abbildung 17: Expression des Somitenmarkergens actc1 in Embryonen von X. laevis nach Behandlung mit Flupyradifuron. A: *Lateralansicht von Embryonen nach WMISH mit actc1-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen von vier unabhängigen Versuchen mit abnormaler actc1 Expression. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (100 mg/l) behandelten Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

3.2.4 Einfluss von Flupyradifuron auf die Augenentwicklung von *X. laevis* Embryonen

Im Anschluss wurden die Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* hinsichtlich der Augen untersucht.

Die Auswertung bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen zeigte signifikante Verkleinerungen der Augen nach Inkubation in allen Konzentrationen (0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l) (Abb. 18).

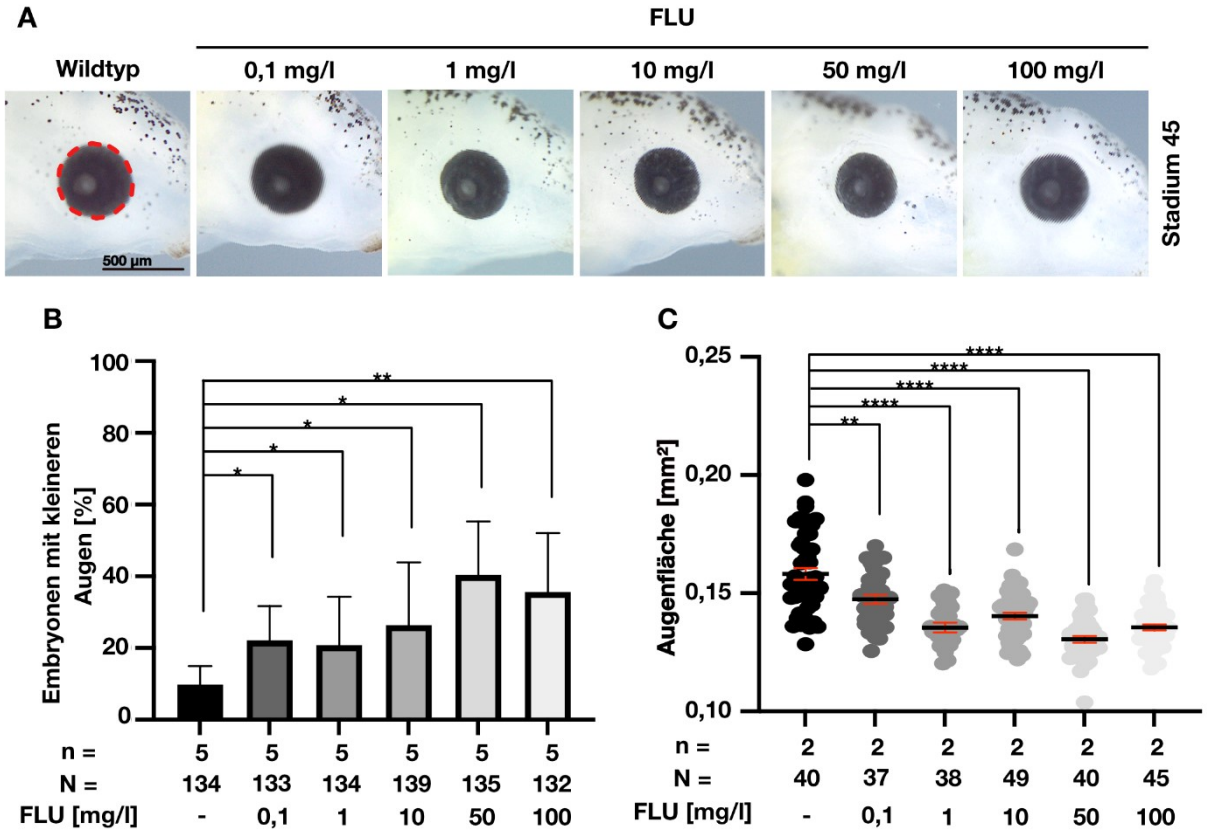

Abbildung 18: Verkleinerung der Augenfläche von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Lateralansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 ,1 ,10 ,50 ,100 mg/l) Flupyradifuron (FLU) inkubierte Embryonen in Stadium 45. Die Messung der Augenfläche erfolgte durch den rot segmentierten Kreis mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen von fünf unabhängigen Versuchen mit veränderten Augen.* ***C:*** *Signifikante Reduktion der Augenfläche nach Inkubation mit 0,1 ,1 ,10 ,50 ,100 mg/l von zwei unabhängigen Versuchen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01; ****≤0,0001.*

Im Folgenden wurden Markergenanalysen durchgeführt, um beurteilen zu können, ob die Ursache der in Abb. 18 ersichtlichen Auswirkungen auf molekulare Ebene zurückzuführen sind. Die Auswertung der Augenmarkergene *pax6* und *rax* in Stadium 23 zeigten nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron keine signifikanten Veränderungen (Abb. 19).

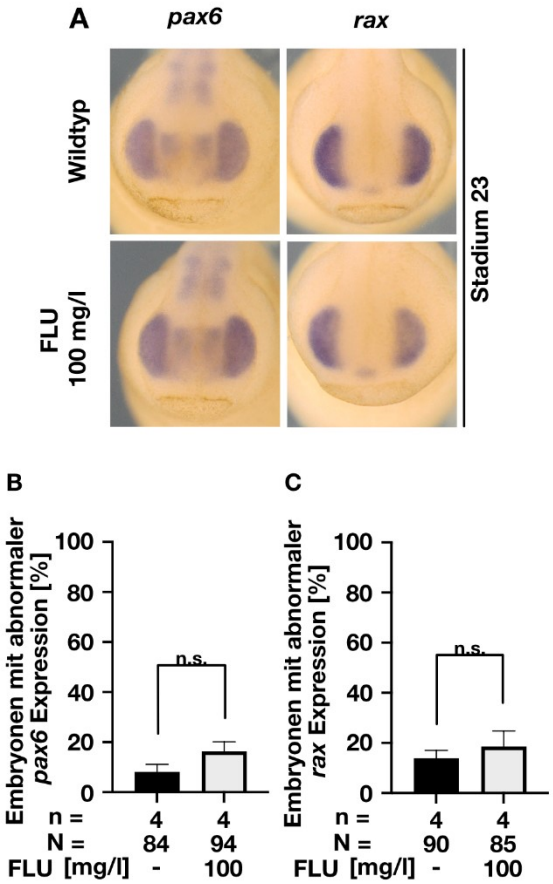

Abbildung 19: Expression der Augenmarkergene pax6 und rax in Embryonen von X. laevis nach Behandlung mit Flupyradifuron. A: *Frontalansicht von Embryonen nach WMISH mit pax6-Sonden bzw. rax-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen von vier unabhängigen Versuchen mit abnormaler pax6 Expression. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (FLU) (100mg/l) inkubierten Embryonen.* ***C:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen von vier unabhängigen Versuchen mit abnormaler rax Expression. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (FLU) (100mg/l) inkubierten Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Da die Untersuchung der Augenmarkergene eine tendenziell verstärkte abnormale Expression aufzeigten, wurde im Anschluss eine Intensitäts- und Flächenmessung des Augenmarkergens *rax* durchgeführt. Es konnte bei beiden Parametern eine signifikante Reduktion nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron von *X. laevis* nachgewiesen werden (Abb. 20).

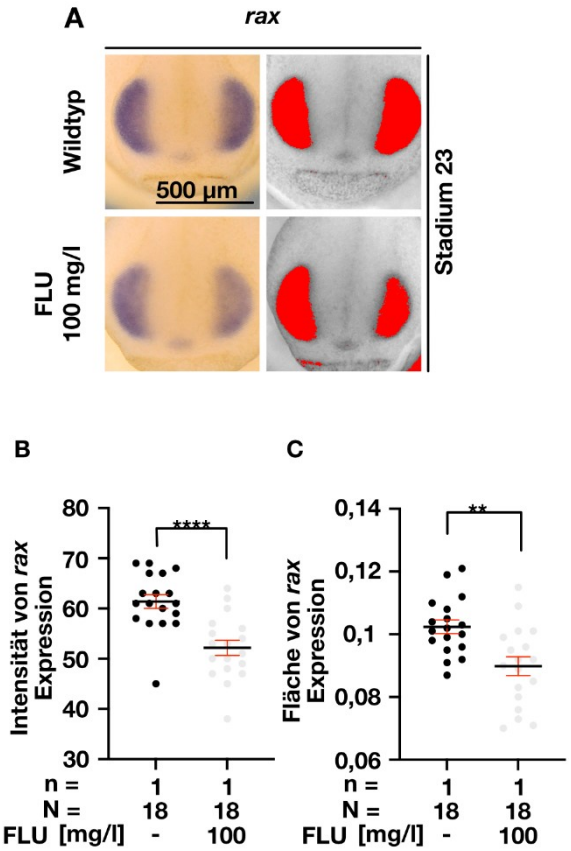

Abbildung 20: Intensitäts- und Flächenmessung des Augenmarkers rax bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Frontalansicht von Embryonen nach WMISH mit rax-Sonden, links die Intensität, rechts die Fläche.* ***B:*** *Statistische Analyse nach Auswertung der Intensität und Fläche bei Embryonen von X. laevis nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron (FLU). Signifikante Reduktion beider Parameter. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen; **p≤0,01; ****≤0,0001.*

3.2.5 Einfluss von Flupyradifuron auf die Kopfentwicklung von *X. laevis* Embryonen

Neben den bereits beschriebenen Phänotypen fielen veränderte Kopfgrößen auf. Die Untersuchung des Kopfes bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen ergab nach Inkubation mit den Konzentrationen 1, 10, 50 und 100 mg/l eine signifikante Verkleinerung der Kopfbreite (Abb. 21A, B; C) und Kopffläche (Abb. 21A, D) bei quantitativer Ausmessung von Embryonen zweier repräsentativer Experimente.

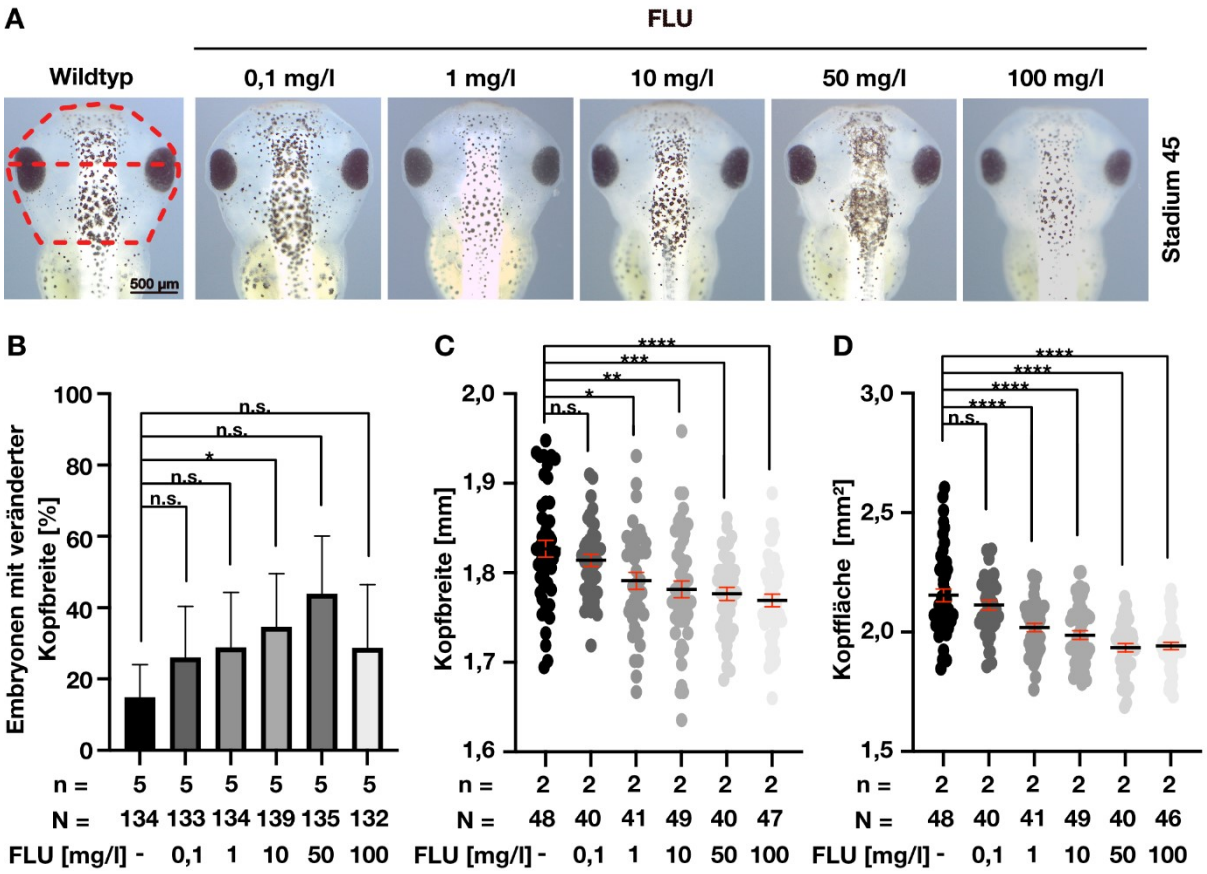

Abbildung 21: Reduktion der Kopfbreite und Kopffläche bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. ***A:*** *Dorsalansicht eines Wildtyps und mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 ,1 ,10 ,50 ,100 mg/l) Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen in Stadium 45. Die Messung der Kopfbreite und Kopffläche erfolgte durch die rot segmentierte Linie bzw. den rot segmentierten Kreis mittels Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 500 µm. B: Prozentualer Anteil der Embryonen mit veränderter Kopfbreite nach Behandlung mit Flupyradifuron nach Inkubation mit 0,1, 1, 10, 50 und 100 mg/l. Signifikante Veränderung nach Inkubation mit 10 mg/l.* ***B:*** *Signifikante Reduktion der Kopfbreite bei Embryonen von fünf unabhängigen Versuchen ab einer Konzentration von 1 mg/l Flupyradifuron.* ***C:*** *Signifikante Reduktion der Kopffläche bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis von zwei unabhängigen Versuchen nach Inkubation mit 1, 10, 50 und 100 mg/l. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01; ****≤0,0001.*

Um die Ursache der veränderten Kopfbreite und -fläche herauszufinden, wurden Knorpel von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen nach einer Alcian-Blau-Färbung isoliert und mit Knorpeln von Wildtyp-Embryonen in Stadium 45/46 verglichen. Es konnte eine Verkleinerung der Knorpel mit zunehmender Konzentration festgestellt werden (Abb. 22).

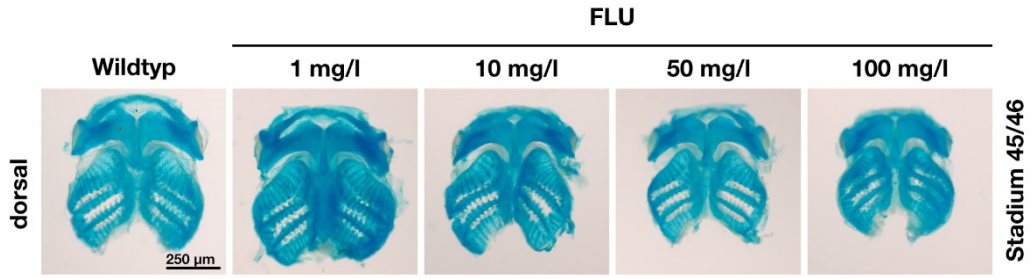

Abbildung 22: Verkleinerung des Knorpels von mit Flupyradifuron (FLU) behandelten Embryonen von X. laevis. *Dosisabhänge Verkleinerung nach Isolierung der Knorpel sichtbar.*

Im Folgenden wurde eine Analyse des Gehirns, als weiters Derivat des Neuralgewebes, gemacht, ob die Behandlung mit Flupyradifuron und der verkleinerte Knorpel, der das Gehirn umgibt, Einfluss auf das Gehirn haben. Hierfür wurden Gehirne von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von *X. laevis* und Wildtyp-Embryonen aus zwei unabhängigen Experimenten isoliert und anschließend ausgemessen (Abb. 23). Die statistische Analyse der Messwerte zeigte keine statistischen Veränderungen.

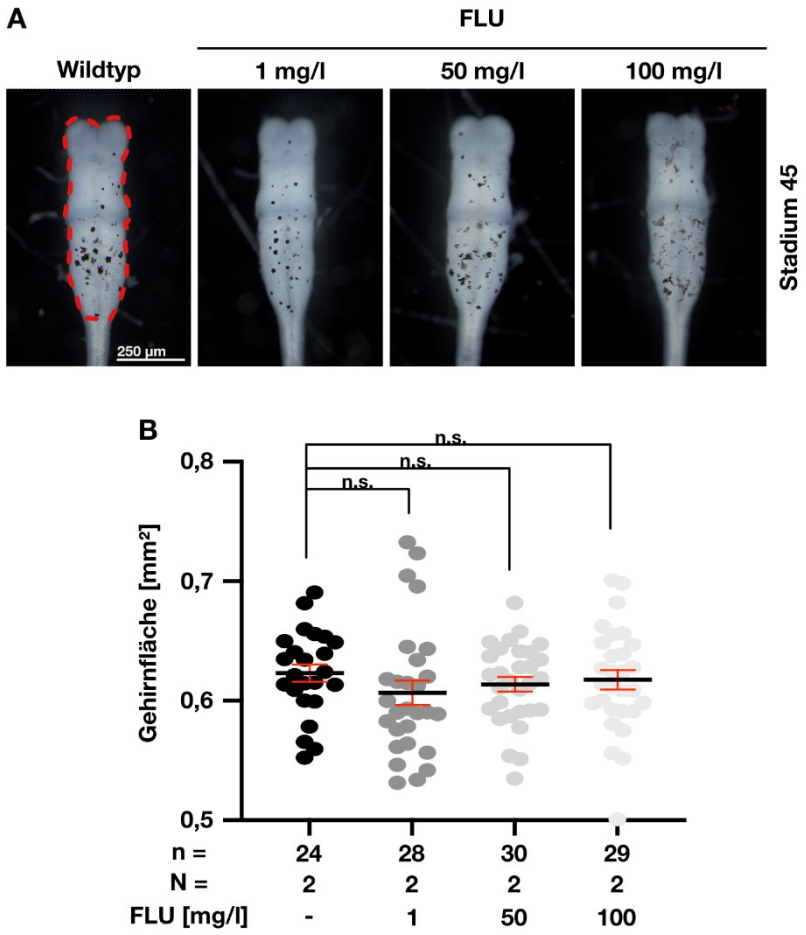

Abbildung 23: Auswirkungen auf die Gehirnfläche von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Dorsalansicht der isolierten Gehirne von unbehandelten und mit Flupyradifuron (FLU) (1, 50 und 100 mg/l) inkubierten Embryonen. Die rot segmentierte Linie zeigt die Messung der Gehirnfläche durch Fiji/ImageJ64. Maßstabbalken: 250 µm.* ***B:*** *Statistische Auswertung der in A gezeigten Gehirnfläche von Embryonen von zwei unabhängigen Versuchen. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Zur Beurteilung, ob Flupyradifuron Einfluss auf histologische Strukturen des Gehirns hat, wurden an drei unabhängigen Experimenten nach einer 3A10-Antikörperfärbung in Stadium 45 die Länge von gut sichtbaren Nerven ausgemessen (Abb. 24). Die Behandlung von Embryonen mit Flupyradifuron führte nach Inkubation mit 100 mg/l zu einer signifikanten Verlängerung des N. *trigeminus* auf der dorsalen Seite der Embryonen (Abb. 24bC). Der *N. glossopharyngeus,* dorsal gemessen (Abb. 24aB), der *N. hypoglossus*, ebenfalls dorsal gemessen(Abb. 24aC), der *N. mandibularis* (Abb. 24bA) sowie der *N. opticus,* beide ventral gemessen (Abb. 24bB) zeigten keine signifikanten Veränderungen.

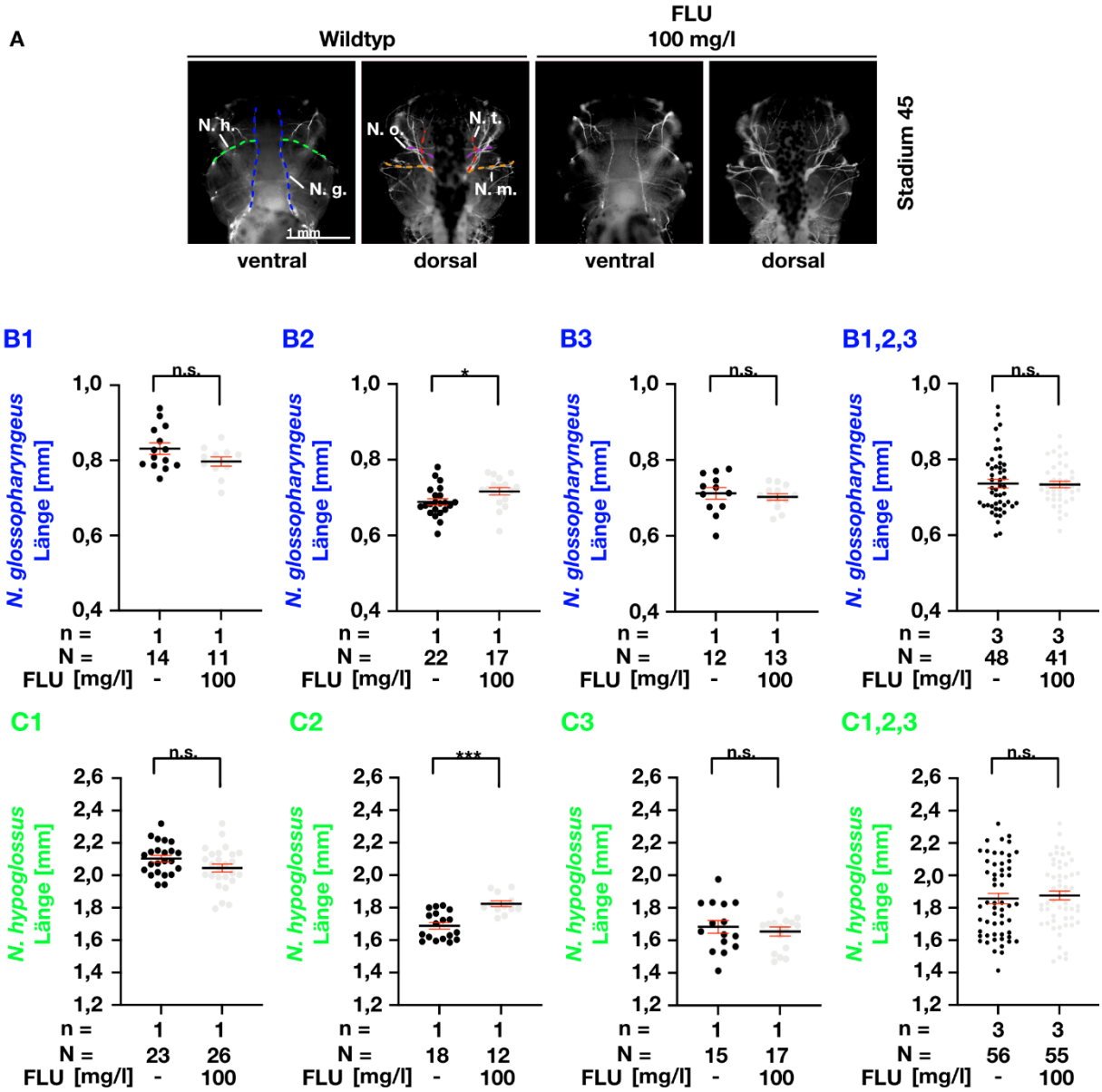

Abbildung 24a: Auswirkungen auf ventral gemessenen Hirnnerven von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Dorsale und ventrale Ansicht des Kopfes der mit Flupyradifuron (FLU) behandelten und der unbehandelten Embryonen nach Färbung mit einem 3A10-Antikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop. Farbig markiert mit segmentierten Linien sind die mit Fiji/ImageJ64 ausgemessenen Hirnnerven (blau: N. glossopharyngeus, grün: N. hypoglossus, orange: N. mandibularis, violett: N. opticus, rot: N.trigeminus dorsal). Maßstabbalken: 1 mm. Die Graphen 1-3 zeigen jeweils die einzelnen unabhängigen Versuche, Graph 1,2,3 zeigt die statistische Auswertung aller drei Versuche zusammen.* ***B1;3:*** *Es wurden keine signifikanten Veränderungen des N. glossopharyngeus (blau) nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron in den beiden unabhängigen Versuchen festgestellt.* ***B2:*** *Es konnte eine signifikante Veränderung des N. glossopharyngeus festgestellt werden.* ***B1,2,3:*** *Es wurden keine signifikanten Veränderungen des N. glossopharyngeus (blau) bei Betrachtung aller unabhängigen Experimente zusammen beobachtet.* ***C1;3****: Bei Betrachtung des N. hypoglossus (grün) konnten keine signifikanten Veränderungen bei mit 100 mg/l Flupyradifuron inkubierten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen in den beiden unabhängigen Versuchen festgestellt werden.* ***C2****: Die Ausmessung des N. hypoglossus zeigte eine signifikante Verlängerung bei den mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen.* ***C1,2,3:*** *Bei Analyse aller drei unabhängigen Versuche zusammen ergab sich keine signifikante Veränderung des N. hypoglossus.*

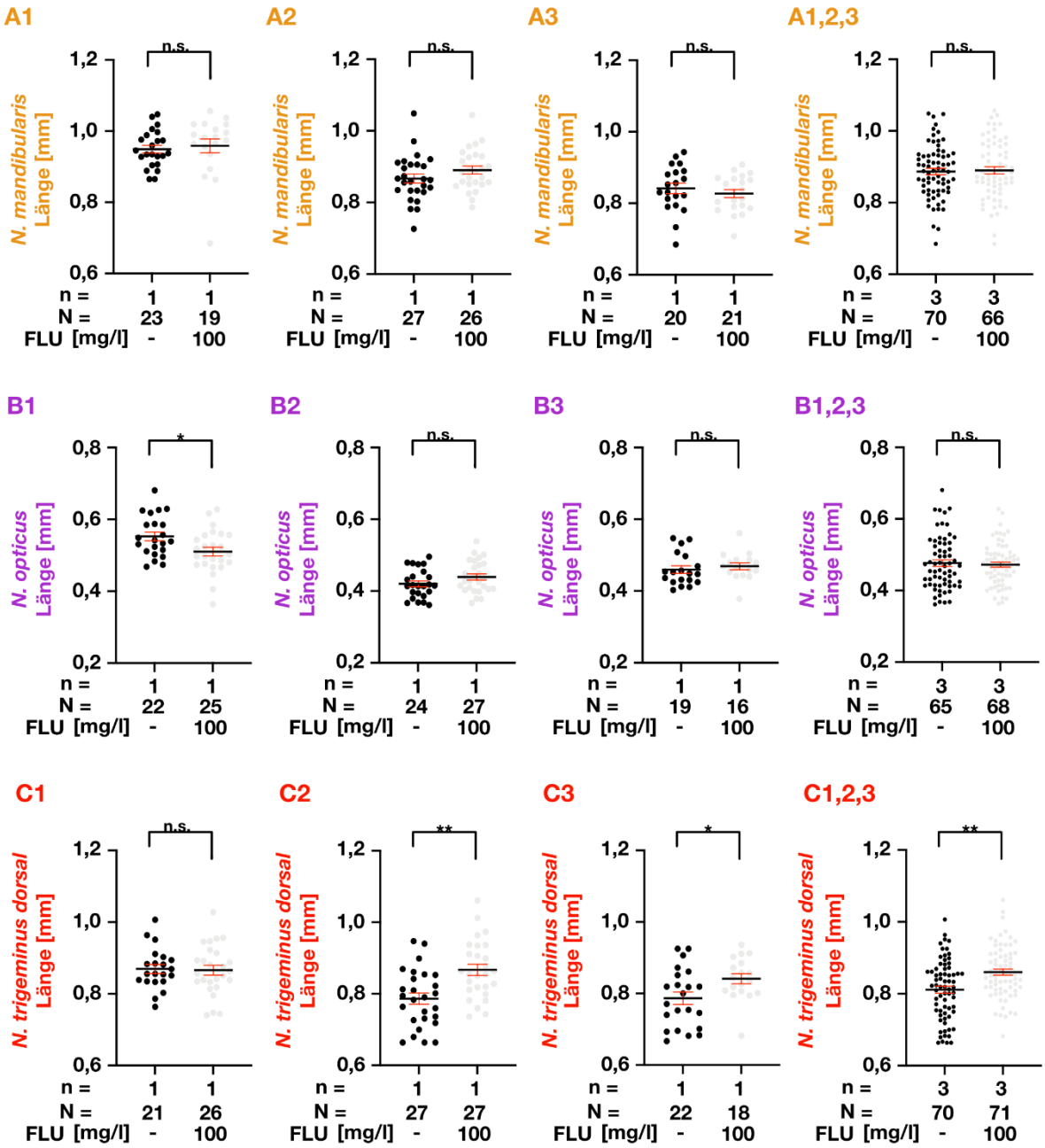

Abbildung 24b: Auswirkungen auf dorsal gemessene Hirnnerven von mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A1-3: *Es wurden keine signifikanten Veränderungen des N. mandibularis (orange) festgestellt.* ***A1,2,3:*** *Die Auswertung aller drei unabhängigen Versuche zusammen ergab keine signifikante Veränderung hinsichtlich des N. mandibularis.* ***B1****: Es konnte eine signifikante Reduktion der Länge des N. opticus festgestellt werden.* ***B2; 3:*** *Es wurden keine signifikanten Veränderungen des N. opticus (violett) bei mit 100 mg/l Flupyradifuron behandelten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen in den beiden unabhängigen Versuchen festgestellt.* ***B1,2,3****: Es wurden keine signifikanten Veränderungen des N. opticus bei Betrachtung aller unabhängigen Versuche zusammen festgestellt.* ***C1:*** *Es konnte keine Veränderung des N. trigeminus dorsal gezeigt werden.* ***C2, C3:*** *Signifikante Verlängerung des N. trigeminus dorsal.* ***C1,2,3****: Signifikante Verlängerung des N. trigeminus dorsal bei mit 100 mg/l behandelten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01; ***≤0,001.*

Ob die Verlängerung des *N. trigeminus* aufgrund einer Vergrößerung des Kopfes in Längsachse, in der auch der Nerv verläuft, zustande kommt, wurde durch Ausmessung des Kopfes überprüft. Die statistische Analyse der Messwerte zeigte keine signifikante Veränderung (Abb. 25), jedoch ist eine Tendenz zur Verkleinerung zu sehen. Die Kontrolle weist eine hohe Varianz auf.

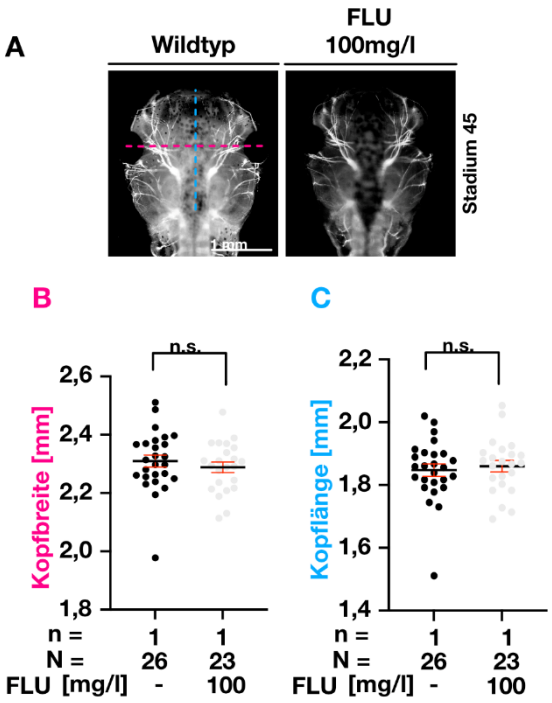

Abbildung 25: Auswirkungen auf Kopfbreite und Kopflänge bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von X. laevis. A: *Dorsale Ansicht des Kopfes eines mit Flupyradifuron (FLU) behandelten und unbehandelten Embryos nach Färbung mit einem 3A10-Antikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop. Farbig markiert mit segmentierten Linien sind die mit Fiji/ImageJ64 ausgemessene Kopfbreite (magenta) und Kopflänge (blau). Maßstabbalken: 1 mm.* ***B:*** *Die Ausmessung der Kopfbreite und Kopflänge zeigte keine signifikante Veränderung nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). N: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Aufgrund der bei den vorangegangenen Versuchen ersichtlichen Auswirkungen von Flupyradifuron auf Knorpel und Hirnnerven, beides Derivate der Neuralleistenzellen, erfolgte eine Markergenanalyse der Neuralleistengene *egr2* und *twist* (Abb. 26A).

Die Auswertung auf molekularer Ebene zeigte keine signifikanten Veränderungen in Stadium 23 bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von *X. laevis* nach Inkubation mit 100 mg/l von *X. laevis* (Abb. 26B, C).

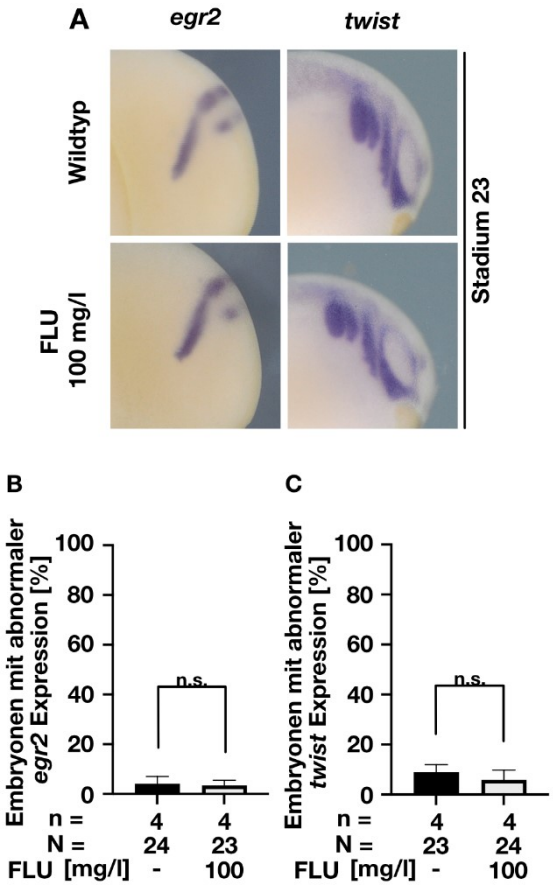

Abbildung 26: Expression der Neuralleistenmarkergene egr2 und twist in Embryonen von X. laevis in Stadium 23 nach Behandlung mit Flupyradifuron. ***A:*** *Lateralansicht von Embryonen nach WMISH mit egr2-Sonden bzw. mit twist-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil nach mit Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen mit abnormaler Expression von egr2.* ***C:*** *Prozentualer Anteil der Embryonen mit abnormaler twist-Expression. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (100 mg/l) inkubierten Embryonen von vier unabhängigen Versuchen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Zur weiteren Untersuchung des Nervensystems wurde eine Markergenanalyse von *alcam* und *sox3* in Stadium 32 durchgeführt. Diese sind Plakodenmarker und bilden zusammen mit den Neuralleistenzellen (siehe 4.3.2) das periphere Nervensystem. Es

konnte eine Tendenz zur Verstärkung der abnormalen Expression, aber keine Signifikanz nach Inkubation mit 100 mg/l Flupyradifuron bezüglich abnormaler Expression der beiden Markergene festgestellt werden (Abb. 27).

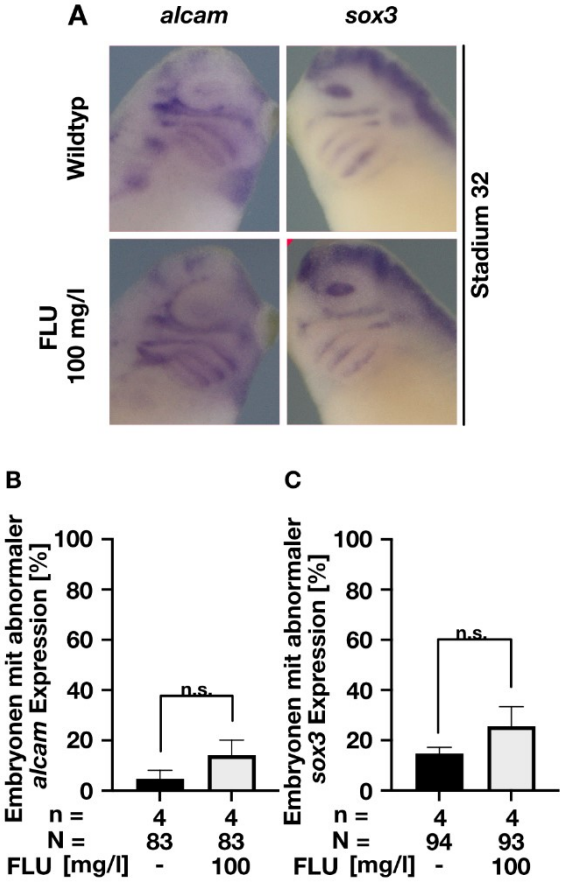

Abbildung 27: Expression der Markergene alcam und sox3 in Embryonen von X. laevis in Stadium 32 nach Behandlung mit Flupyradifuron. ***A:*** *Lateralansicht von Embryonen nach WMISH, links mit alcam-Sonden, rechts mit sox3-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen mit abnormaler Expression von alcam. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (100mg/l) behandelten Embryonen von vier unabhängigen Versuchen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen.* ***C:*** *Prozentualer Anteil der Embryonen mit abnormaler sox3 Expression. Es konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Wegen der erkennbaren Tendenz zur abnormalen Expression der Plakodenmarker wurde im Anschluss eine Längenmessung der Plakoden nach WMISH mit der *sox3*-

Sonde durchgeführt (Abb. 28A). Diese ergab eine signifikante Verkürzung der *sox3* Expression in den Plakoden IX und X (Abb. 28B).

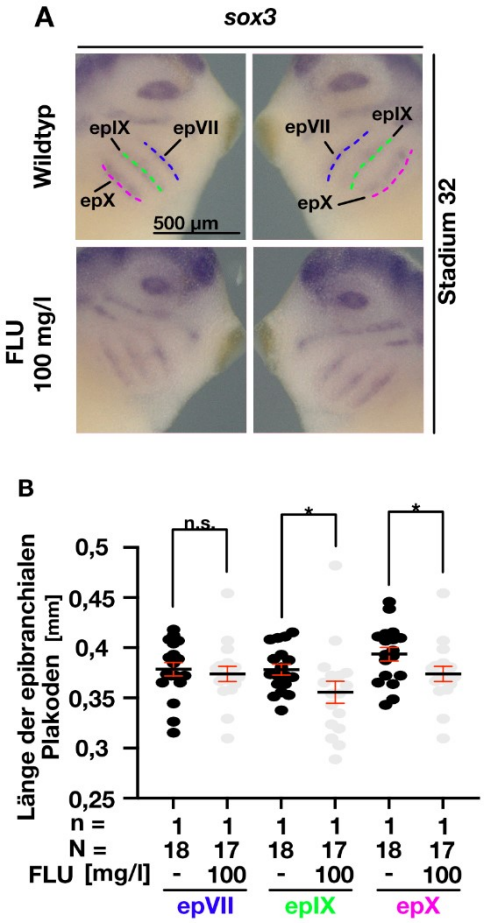

Abbildung 28: Längenmessung der epibranchialen Plakoden in Embryonen von X. laevis in Stadium 32 nach Behandlung mit Flupyradifuron (FLU). A: *Lateralansicht von Embryonen nach WMISH. Farbig markiert mit segmentierten Linien sind die mit Fiji/ImageJ64 ausgemessenen epibranchialen Plakoden (ep) VII (blau), IX (grün), X (magenta). Maßstabbalken: 500 µm.* ***B:*** *Statistische Analyse der Ausmessungen. Die epIX und X sind signifikant verkürzt. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05.*

3.2.6 Einfluss von Flupyradifuron auf die Herzentwicklung von *X. laevis* Embryonen

Um mögliche Auswirkungen auf das Herz beurteilen zu können, wurden zunächst Herzen isoliert und dann die Atrium-, Ventrikelbreite und Herzlänge vermessen (Abb.

29). Es zeigte sich bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen ab einer Konzentration von 50 mg/l eine signifikante Vergrößerung des Herzens. Die Atriumbreite (Abb. 29B) zeigte wie die Gesamtlänge des Herzens (Abb. 29C) nach Inkubation mit 50 mg/l Flupyradifuron eine signifikante Vergrößerung. Die Ventrikelbreite war zusätzlich bei 100 mg/l signifikant vergrößert (Abb. 29C).

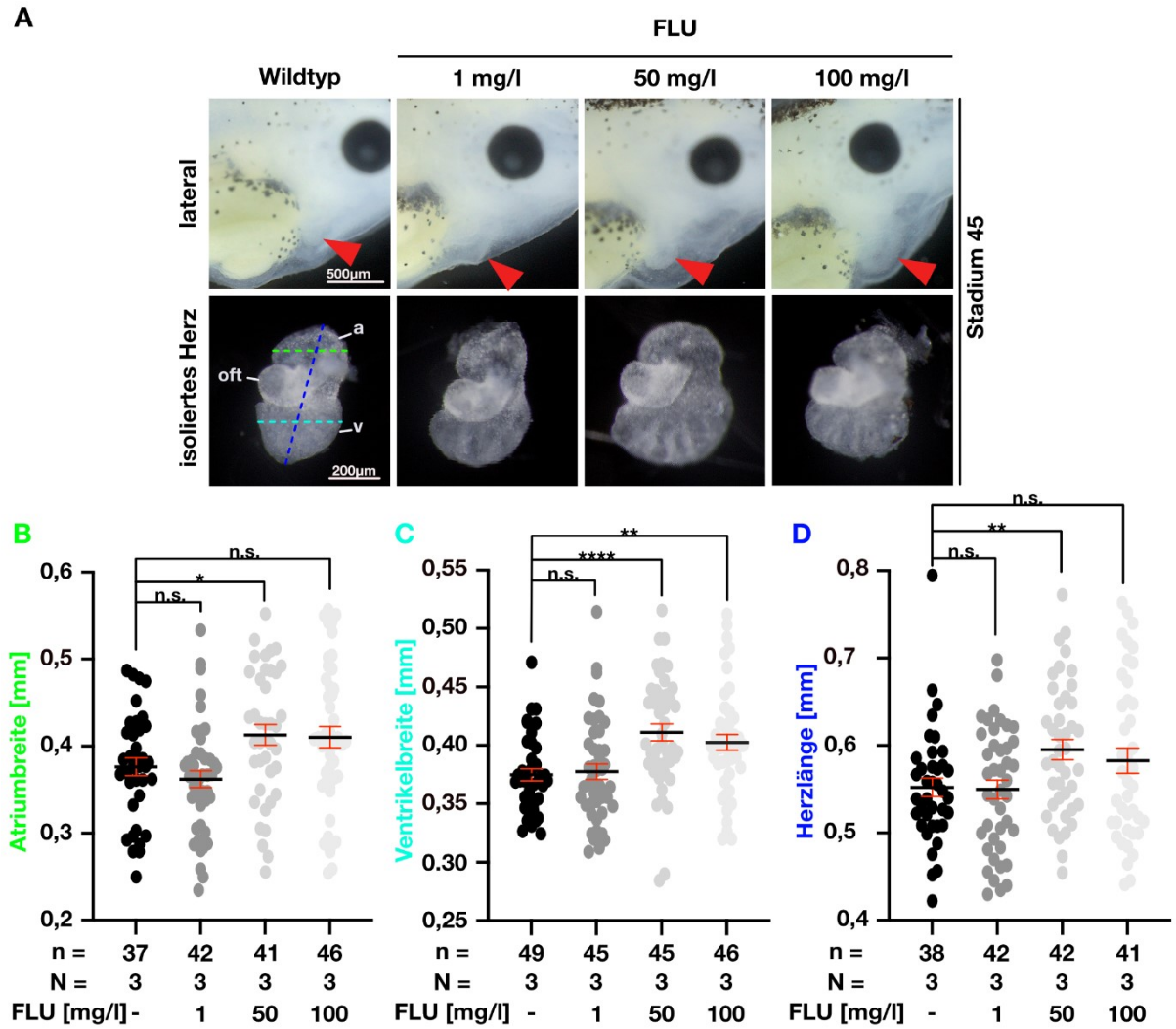

Abbildung 29: Veränderungen der Herzgröße bei Embryonen von X. laevis in Stadium 45 nach Behandlung mit Flupyradifuron. A: *Lateralansicht von unbehandelten und mit verschiedenen Konzentrationen (1, 50, 100 mg/l) Flupyradifuron (FLU) behandelten Embryonen (obere Reihe). Mit rotem Pfeil markiert ist das Herz. Ventralansicht des isolierten Herzens des jeweiligen darüber liegenden Embryos (untere Reihe). Farbig markiert mit segmentierten Linien sind die mit Fiji/ImageJ64 ausgemessenen Parameter: Atriumbreite (grün), Ventrikelbreite (türkis), Herzlänge (blau). Das Atrium ist mit „a" markiert, der Ventrikel mit „v". „oft" entspricht dem Ausflusstrakt. Maßstabbalken: 250 µm.* ***B:*** *Die Atriumbreite (grün) ist nach Inkubation mit 50 mg/l signifikant breiter bei den mit Flupyradifuron*

behandelten Embryonen von drei unabhängigen Versuchen. ***C:*** *Die Ventrikelbreite (türkis) ist signifikant breiter bei einer Flupyradifuron-Konzentration von 50 und 100 mg/l.* ***D:*** *Die Herzlänge (blau) ist nach Inkubation mit 50 mg/l signifikant länger. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05; *p≤0,05; **p≤0,01; ****≤0,0001.*

Zur Beurteilung der oben genannten Ergebnisse im nicht präparierten Embryo wurde eine Herzantikörperfärbung mit Cardiac Troponin T (tnnt2) durchgeführt und die Herzgröße durch optischen Vergleich mit dem Fluoreszensmikroskop beurteilt (Abb. 30). Es zeigte sich eine Vergrößerung des Herzens bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen in Stadium 45.

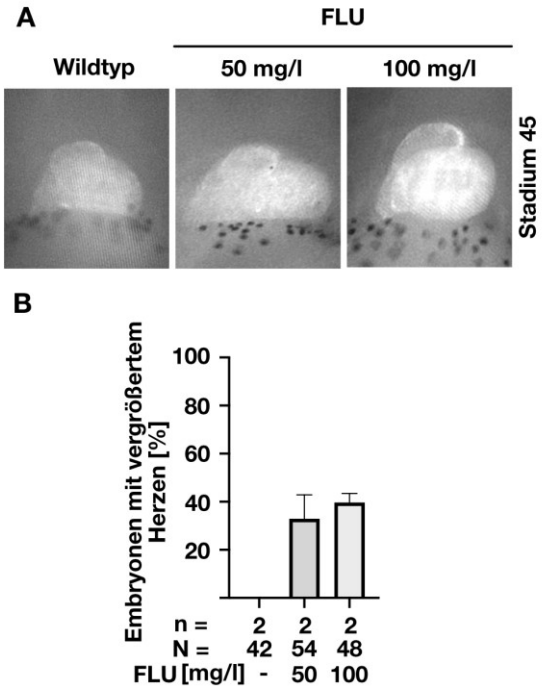

Abbildung 30: Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Herzgröße bei Embryonen von X. laevis **durch tnnt2 Antikörperfärbung.** ***A:*** *Ventrale Ansicht des Herzens von mit Flupyradifuron (FLU) behandelten und unbehandelten Embryonen nach Färbung mit dem Cardiac Troponin T-Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der Embryonen mit vergrößertem Herzen von mit Flupyradifuron (50 und 100 mg/l) inkubierten Embryonen von zwei unabhängigen Versuchen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). N: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen.*

Zur funktionellen Überprüfung des Herzens nach Inkubation der Embryonen mit Flupyradifuron wurde eine Messung der Herzfrequenz in Stadium 45 durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 31).

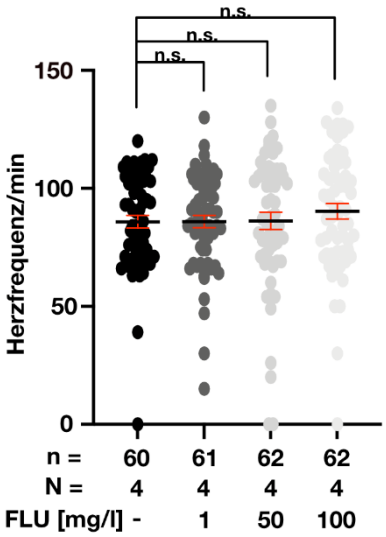

Abbildung 31: Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Herzfrequenz von Embryonen von X. laevis. *Herzfrequenzmessung der Embryonen in Stadium 45, die mit 10 und 100 mg/l Flupyradifuron (FLU) behandelt wurden, sowie der Kontrollgruppe von vier unabhängigen Versuchen. Die Herzfrequenz wurde für 1 min mittels Handzähler gemessen. Es wurde bei keiner Konzentration eine signifikante Veränderung beobachtet. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). N: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Ob Flupyradifuron Einfluss bezüglich des Herzens auf molekularer Ebene hat, wurde eine Markergenanalyse mit *isl1* und *nkx2.5* in Stadium 20 durchgeführt (Abb. 32A). Es waren keine Veränderungen bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen nach Inkubation mit 100 mg/l ersichtlich (Abbildung 32B, C).

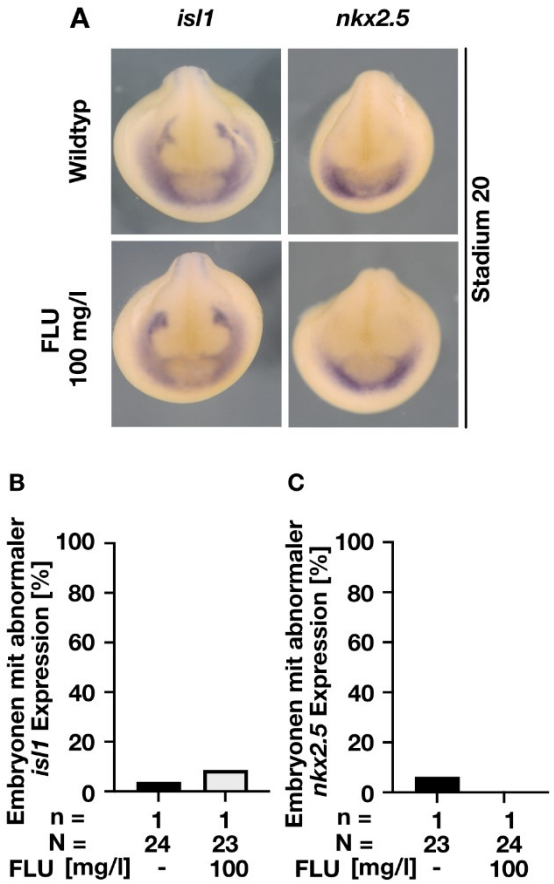

Abbildung 32: Expression der Markergene isl1 und nkx2.5 in Embryonen von X. laevis in Stadium 20 nach Behandlung mit Flupyradifuron. ***A:*** *Frontalansicht von Embryonen nach WMISH mit isl1-Sonden bzw. mit nkx2.5-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron (FLU) behandelten Embryonen mit abnormaler Expression von isl1 ohne signifikante Veränderung.* ***C:*** *Prozentualer Anteil der Embryonen mit abnormaler nkx2.5-Expression. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (100 mg/l) behandelten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen,*

In Stadium 28 zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Herzmarkergene *mhcα, nkx2.5* und *actc1* (Abb. 33).

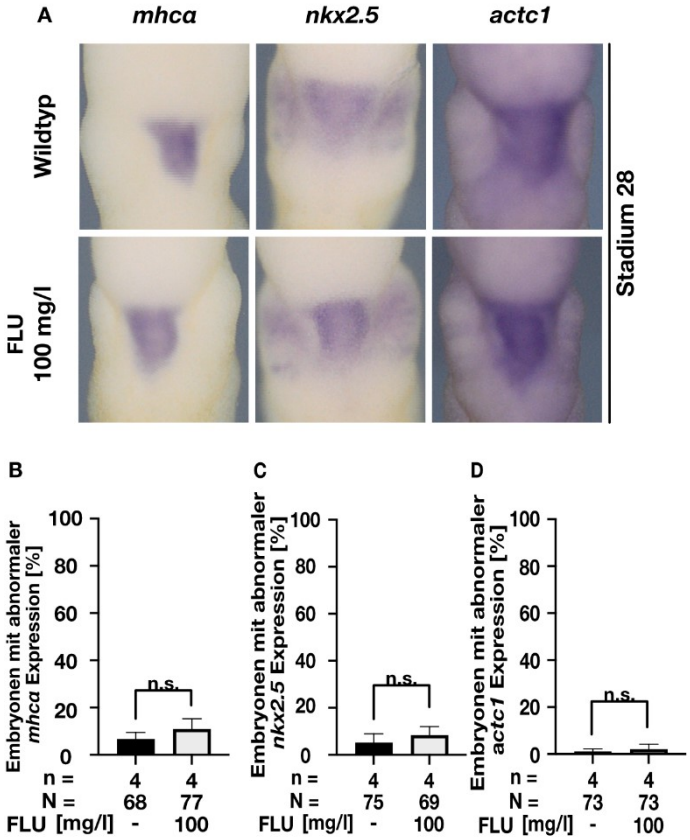

Abbildung 33: Expression der Markergene mhcα, nkx2.5 und actc1 in Embryonen von X. laevis in Stadium 28 nach Behandlung mit Flupyradifuron. A: *Ventralansicht von Embryonen von vier unabhängigen Versuchen nach WMISH mit mhcα -Sonden, nkx2.5-Sonden bzw. mit actc1-Sonden.* ***B:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron (FLU) inkubierten Embryonen mit abnormaler mhcα Expression ohne signifikante Veränderung.* ***C:*** *Flupyradifuron zeigt keinen Einfluss auf die nkx2.5 Expression.* ***D:*** *Prozentualer Anteil der mit Flupyradifuron inkubierten Embryonen mit abnormaler actc1 Expression im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron (100 mg/l) inkubierten Embryonen. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert aller Werte und zusätzlich den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

Zur quantitativen Analyse der Auswirkungen von Flupyradifuron auf das Herz auf molekularer Ebene wurde eine Intensitäts- und Flächenmessung des Herzmarkergens *mhcα* gemacht (Abb. 34). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen in Stadium 23.

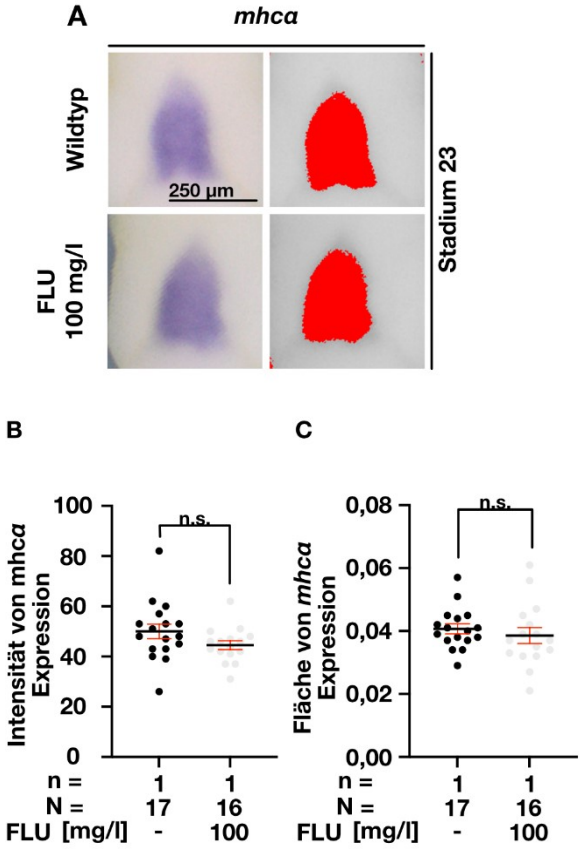

Abbildung 34: Ausmessung der Intensität und Fläche des Herzmarkers mhcα bei mit Flupyradifuron (FLU) behandelten Embryonen von X. laevis. ***A:*** *Ventralansicht von Embryonen nach WMISH mit mhcα-Sonden.* ***B****: Statistische Analyse nach Auswertung der Intensität bei Embryonen von X. laevis, die mit 100 mg/l Flupyradifuron inkubiert wurden. Keine signifikante Veränderung.* ***C****: Die Analyse der Fläche von mhcα bei mit Flupyradifuron exponierten Embryonen zeigte keine signifikante Veränderung. Die statistischen Daten wurden mit dem nichtparametrischen Man-Whitney t-Test analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). n: Anzahl der unabhängigen Experimente, N: Anzahl der ausgewerteten Embryonen, n.s.: nicht signifikant; n.s. p>0,05.*

4. Diskussion

Die Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen dem Neonicotinoid Thiamethoxam bzw. dem Butenolid Flupyradifuron und einer Veränderung der embryonalen Entwicklung von *X. laevis* schließen.

4.1 Auswirkungen von Thiamethoxam

4.1.1 Mortalitätsrate bei mit Thiamethoxam inkubierten Embryonen von *X. laevis*

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der Mortalität durch die Behandlung mit Thiamethoxam nachgewiesen werden. Dies bestätigt auch die Studie von Liu *et al.*, in der sie die Auswirkungen von Thiamethoxam auf den Zebrafisch *Danio rerio* nach Inkubation mit 0,01, 1 und 100 mg/l untersuchten und keine Veränderung hinsichtlich der Überlebensrate zeigen konnten [30]. Thompson *et al.*, bei der keine Veränderung der Lebenserwartung bei Bienen beobachtet werden konnte, die sich auf Futtersuche auf mit Thiamethoxam behandelten Rapsfeldern gemacht hatten, bestätigt dies auch für Nicht-aquatische Organismen [47].

Eine signifikante Reduktion der Überlebensrate konnte bei Larven der Eintagsfliege *Cleon dipterum* nach Exposition mit Thiamethoxam beobachtet werden. Die ,,No observed effected concentration" (NOEC) lag bei 0,3 µg/l [40]. Der NOEC dient zur Interpretation der Ergebnisse von Ökotoxizitätstests und gibt den beobachteten höchsten Wert an, bei dem gerade noch keine Wirkung zu erkennen ist [9]. Dies liegt im Widerspruch zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie und kann aufgrund der wesentlich größeren Wirkung der Neonicotinoide auf Insekten zurückzuführen sein [49]. Zudem war der experimentelle Aufbau unterschiedlich. Bei Pickford *et al.* wurde zweimal wöchentlich Thiamethoxam in einen künstlichen Teich gegeben. Die erneute Zugabe kann eventuell zu einer höheren Sterblichkeit der Larven geführt haben. Zudem wurde die Wassertemperatur in der Regel nur einmal pro Woche kontrolliert und dies auch nur in einer Tiefe von 50 cm, weshalb bei einer Wassertiefe von 150 cm

unkontrollierte Temperaturschwankungen möglich gewesen sein könnten, die ebenfalls Ursache der höheren Sterblichkeit sein könnten. Zusätzlich wurde Thiamethoxam von einem anderen Hersteller als in der vorliegenden Arbeit verwendet, weswegen Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung vorliegen könnten, die ebenfalls zu unterschiedlichen Auswirkungen führen könnten [40].

4.1.2 Einfluss von Thiamethoxam auf den Phänotyp der Embryonen von *X. laevis*

Die hier vorliegende Studie zeigte eine signifikante Vergrößerung der Körperlänge und Kopfgröße von *X. laevis* nach Exposition mit Thiamethoxam. Eine Studie von Liu *et al.*, in der die Auswirkung von Thiamethoxam auf den Zebrafisch *Danio rerio* untersucht wurde, ergab bei ähnlichem Konzentrationsbereich (0,01 bis 100 mg/l) keine signifikanten Veränderungen der Körperlänge im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen [30]. Der unterschiedliche experimentelle Versuchsaufbau, bei dem je 30 Embryonen in eine Vertiefung der 6-Well-Platte überführt wurden und damit doppelt so viele wie in der vorliegenden Arbeit, könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen sein. Allerdings sind die Embryonen mit etwa 4 mm halb so groß, wie die Embryonen von *X. laevis*, weswegen der Vergleich schwierig ist. Weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene sollten daher erfolgen, ob unterschiedliche Mechanismen beim *X. laevis* und *Danio rerio* zu finden sind. Eine mögliche Erklärung der größeren Körperlänge und des vergrößerten Kopfes der Embryonen von *X. laevis* ist, dass es durch Thiamethoxam, das nicht durch die Acetylcholinesterase abgebaut werden kann, zu einer dauerhaften Stimulation des nAChR kommen könnte. So konnte bei einer Studie von Rodrigues et al. ab 50 mg/l Thiamethoxam eine Verringerung der Acetylcholinesteraseaktivität nachgewiesen werden [42]. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass ein Einfluss auf das vegetative System besteht, weshalb es zu einem gesteigerten Stoffwechsel und daher zu einer Vergrößerung der Körperlänge und des Kopfes kommen könnte.

Die bereits erwähnte Studie von Liu *et al.* zeigte am *Danio rerio*, wie die hier vorliegende Arbeit, keine Veränderung der Augenfläche [30]. Somit ist anzunehmen, dass Thiamethoxam bei Konzentrationen von 0,1,1 und 100 mg/l Spezies-übergreifend keinen Einfluss auf die Augenentwicklung, die mit der Differenzierung der vorderen Neuralplatte ab Stadium 12,5 beginnt, hat [37] [25]. Weshalb die Ausmessungen der Augen in der hier vorliegenden Arbeit nicht übereinstimmen mit dem optischen Vergleich unter Zuhilfenahme eines Mikroskops, könnte daran liegen, dass nur ein Versuch ausgemessen wurde. Der Versuch der ausgemessen wurde, wurde als repräsentativer Versuch anhand der Ergebnisse der Körperlänge bestimmt. Es könnte allerdings sein, dass er für die Größe der Augen nicht repräsentativ gewesen ist. Daher ist zu empfehlen, dass weitere Versuche ausgemessen werden.

Aufgrund der beobachteten Veränderungen der Mobilität der mit 100 mg/l Thiamethoxam behandelten *Xenopus* Embryonen wären WMISH-Experimente beispielsweise mit den Markergenen *actc1* oder *mef2c* sinnvoll, um Rückschlüsse über den Zusammenhang der veränderten Mobilität und Einflüsse auf molekularer Ebene ziehen zu können, wodurch physiologische Ursachen aufgrund veränderter Somiten oder anderer Gewebe, wie Muskeln, gezeigt werden könnten. Am Zebrafisch konnte bereits nach Exposition mit dem Neonicotinoid Acetamiprid eine Verformung der Wirbelsäule festgestellt werden, was Ursache für eine veränderte Mobilität sein könnte [31]. Daher wäre es sinnvoll zu überprüfen, ob die mit Thiamethoxam behandelten Embryonen eine regelrechte Ausbildung der Wirbelsäule aufweisen oder ob die beobachteten Veränderungen in der hier vorliegenden Arbeit auf eine Deformation der Wirbelsäule zurückzuschließen ist. Acetamiprid ist wie Thiamethoxam ein Insektizid, dass zur Klasse der Neonicotinoide gehört und am nAChR bindet [35]. Außerdem könnte die Veränderung auf den Fluchtinstinkt der Embryonen zurückzuführen sein, um der toxischen Substanz zu entkommen. So konnte die Studie von Rodrigues *et al.* an Ratten im Alter von 2,5 Monaten nachweisen, dass nach einer Behandlung mit 100 mg/l Thiamethoxam das Angstverhalten signifikant gesteigert war, welches zum Fluchtverhalten und damit wie in der vorliegenden Arbeit zu einer erhöhten

Durchschnittsgeschwindigkeit und Gesamtdistanz geführt haben könnte [42]. Druckinjektionen von Acetylcholin bzw. Agonisten zeigten an den adulten Wanderheuschrecken *Locusta migratoria* eine Erregung des Interneurons des ventralen Rückenmarks, welches für die Innervation eines Muskels am Flügel zuständig ist und daher Einfluss auf die Motorik haben könnte [17]. Dies könnte eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit sein, da Thiamethoxam zu einer Anhäufung von Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte führt, was eine kontinuierliche Stimulation der Postsynapse bewirkt, wodurch die Mobilität verändert sein könnte [42]. Die Tendenz zur Verringerung der Mobilität bei niedrigen Konzentrationen in der vorliegenden Studie könnte durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses ausgelöst werden. Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie deren Abwehrmechanismen. Ein Ungleichgewicht entsteht durch verschiedene endogene und exogene Prozesse und könnte daher auch durch Thiamethoxam ausgelöst werden. Da oxidativer Stress schädlich für den Organismus ist, könnte daraus eine Veränderung der Mobilität resultieren [56] [28]. Eine Erhöhung des oxidativen Stresses nach der Exposition mit niedrigeren Konzentrationen eines Neonicotinoids wurde bereits an anderen Modellorganismen festgestellt [57].

Durch ein Hochfahren des gesamten Metabolismus sowie einem erhöhten Angstverhalten könnte auch die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigte signifikante Beschleunigung der Herzfrequenz nach Inkubation mit Thiamethoxam erklärt werden. Eine Erhöhung der Herzfrequenz nach Exposition mit dem Neonicotinoid Acetamiprid konnte bereits an anderen Organismen festgestellt werden [31]. Möglich wäre die Mobilisierung von Energiereserven zur Eliminierung des toxischen Stoffes, da die Embryonen nicht entkommen können. Zudem wirkt Thiamethoxam wie oben beschrieben auf den nAChR, der unter anderem im vegetativen Nervensystem vorkommt. Durch Veränderungen in diesem System kann es möglicherweise zur Aktivierung des Sympathikus kommen, welcher positiv chronotrop wirkt, was sich in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit widerspiegelt.

4.2 Einfluss von Flupyradifuron auf die Embryonen von *X. laevis*

4.2.1 Mortalitätsrate bei mit Flupyradifuron behandelten Embryonen von *X. laevis*

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine subletale Wirkung von Flupyradifuron. Bei Bienen, die hingegen in Kontakt mit 4 mg/l Flupyradifuron kamen, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Überlebensrate [19]. Diese unterschiedliche Wirkung in Bezug auf die Letalität könnte aufgrund des N-2,2-Difluoroethylrest von Flupyradifuron zustande kommen, welcher eine erhöhte insektizide Aktivität aufwies [22]. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb Flupyradifuron wie in der Studie von Guo *et al.* auf Bienen letal wirkt und nicht wie in der hier vorliegenden Arbeit auf den *X. laevis* subletal. Eine Studie von Tomizawa und Casida zeigte bei der Salzwassermolluske *Aplysia california* als Modellorganismus für Insekten, dass Azidon-Nicotinoid-Sonden in einer einzigen Konformation gebunden haben, während bei der Süßwasserschnecke *Lymnea stagnalis* als Modellorganismus für Wirbeltiere die Sonden zwei unterschiedliche, weit entfernte Stellen modifizierten. Diese unterschiedlichen Bindungskonformationen an *Lymnea* und am nAChR von Vertebraten führten zu der geringen Affinität von Neonicotinoiden und der hohen Empfindlichkeit von *Aplysia* bzw. Insekten gegenüber Neonicotinoiden [49].

Zudem könnten die abweichenden Ergebnisse der Studie von Guo *et al.* im Vergleich zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit daran liegen, dass die Honigbienen über sechs Tage mit der Pestizidlösung gefüttert wurden und die Bienen nicht nur eine einzelne Pestizidgabe erhalten haben wie die *X. laevis* Embryonen in der vorliegenden Arbeit [19].

4.2.2 Einfluss von Flupyradifuron auf den Phänotyp und die Mobilität der Embryonen von *X. laevis*

Die Untersuchungen der mit Flupyradifuron behandelten Embryonen zeigten im Gegensatz zu den mit Thiamethoxam behandelten Embryonen keine signifikanten

Veränderungen der Körperlänge, was auf die bereits beschriebene veränderte chemische Struktur von Flupyradifuron zurückzuführen sein könnte, weswegen andere Auswirkungen möglich sind [34].

Die Auswertung der Mobilität zeigte eine signifikante Reduktion der Mobilität nach Exposition mit 100 mg/l Flupyradifuron. Diese Auswirkungen sind möglicherweise nicht auf physiologische Veränderungen zurückzuführen, da die Auswertung der Expression von *actc1* in den Somiten keine signifikante Veränderung zeigte. Eine mögliche Erklärung ist eine Erhöhung des oxidativen Stresses, welcher eine Verringerung der Mobilität zur Folge haben könnte. Oxidativer Stress entsteht wie oben beschrieben, durch ein Ungleichgewicht, dass durch Flupyradifuron ausgelöst werden könnte. Da oxidativer Stress schädlich für den Organismus ist, könnte daraus eine Veränderung der Mobilität resultieren [56] [28] .Eine Steigerung des oxidativen Stresses nach Exposition mit Flupyradifuron konnte bereits am Zebrafisch nachgewiesen werden [57]. Während andere Pestizide die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bei Neonicotinoiden nur schwer möglich, weshalb dies vermutlich keine weitere Erklärung der verringerten Mobilität ist [38] [12]. Des Weiteren hat eine Studie von Hesselbach und Scheiner Veränderungen des Bewegungsmusters bei Honigbienen nach Exposition mit Flupyradifuron gezeigt. So waren Winterbienen unter anderem unbeweglicher. Dies könnte auf einen langsameren Metabolismus und damit eine langsamere Entgiftung hindeuten [20]. Dies steht im Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen dieser Studie. So wäre es möglich, dass bei einer Exposition mit 100 mg/l Flupyradifuron der Embryo von *X. laevis* so geschädigt wird, dass der Metabolismus herunterreguliert wird und daher eine Reduktion der Mobilität nachgewiesen werden konnte.

4.2.3 Einfluss von Flupyradifuron auf die Augenentwicklung der Embryonen von *X. laevis*

Die Ausmessung der Augenfläche ergab eine signifikante Verkleinerung nach Inkubation der Embryonen mit Flupyradifuron. Auswirkungen auf die Augen wurden

bereits an mit dem Neonicotinoid Imidacloprid behandelten Wachteln *Colinus virginianus* und aquatischen Organismen wie z.B. dem Zebrafisch *Danio rerio* gezeigt [18] [48]. Dies ist mit den hier vorliegenden Ergebnissen kompatibel, da Flupyradifuron wie Imidacloprid ein Neonicotinoiden ist, da es die gleiche Wirkungsweise hat [34] [39]. Zur Beurteilung, ob ein Einfluss von Flupyradifuron bereits auf molekularer Ebene besteht, wurden die Augenmarker *rax* und *pax6* untersucht. Eine verminderte Expression von *pax6* konnte bei Hühnerembryonen nach Exposition mit Imidacloprid bereits nachgewiesen werden [29]. Da eine Tendenz zur abnormalen Expression in der hier vorliegenden Arbeit zu erkennen war, wurde eine Intensitäts- und Flächenmessung des Markergens *rax* durchgeführt. Diese Ausmessungen zeigten eine signifikante Reduktion der beiden Parameter. Diese Ergebnisse stimmen mit den oben genannten Studien überein und lassen darauf schließen, dass Flupyradifuron schon auf molekularer Ebene Einfluss auf die Entwicklung der Augen hat und unterstützt damit auch die Ergebnisse der Phänotypauswertung, die eine signifikante Reduktion der Augenfläche ergab.

4.2.4 Einfluss von Flupyradifuron auf die Kopfentwicklung von *X. laevis* Embryonen

Zur Beurteilung, weshalb der Kopf signifikant kleiner nach Inkubation mit Flupyradifuron war, wurde eine Alcianblaufärbung mit anschließender Isolierung der Knorpel in Stadium 45/46 durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der Knorpelgröße bei den mit Flupyradifuron behandelten Embryonen, wodurch sich die signifikante Reduktion der Kopfgröße erklären lässt. In einer Studie von Wang *et al.* wurden Hühnerembryonen-Schädel nach Imidacloprid-Behandlung untersucht und zeigten ebenfalls deutliche Entwicklungsdefekte der kraniofazialen Knochen [52].
Dem Gegenüber zeigte die Ausmessung des Gehirns keine signifikanten Veränderungen. In bereits veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass Flupyradifuron Einfluss auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei Bienen hat [21]. Daher wäre es möglich, dass Flupyradifuron Einfluss auf histologische Strukturen des Gehirns hat, jedoch die Gehirnfläche nicht beeinflusst. In der hier vorliegenden Arbeit wurden daher zusätzlich

die Hirnnerven mittels einer 3A10-Antikörperfärbung untersucht, wobei sich bei den Ausmessungen eine große Varianz ergab. Die Problematik der verwendeten Methode ist, dass die Nerven nur in zwei statt in drei Ebenen dargestellt und ausgemessen werden konnten. Zur genaueren Untersuchung der Auswirkungen von Flupyradifuron auf die Entwicklung der kranialen Nerven sollte daher in Zukunft eine Beurteilung mittels eines dreidimensionalen Modells erfolgen. Die Länge des N. *trigeminus* ergab dorsal in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Verlängerung. Um den Grund hierfür zu untersuchen wurde bei einem Versuch die Kopfbreite und Kopflänge ausgemessen. Da wie oben beschriebenen die Phänotypauswertung eine signifikante Reduktion der Kopffläche und Kopfbreite ergab, sollte beurteilt werden, ob die Verlängerung des *N. trigeminus* aufgrund einer Verlängerung des Kopfes zustande kommt, da dieser Nerv im Gegensatz zu den anderen gemessenen Nerven, die keine Signifikanz zeigten, in Längsachse des Kopfes verläuft. Die Vermutung einer Verlängerung des Kopfes bestätigte sich allerdings nicht. Weshalb eine Veränderung bei Bienen gezeigt werden konnte liegt vermutlich wie bereits erwähnt an der erhöhten insektiziden Aktivität von Flupyradifuron [21] [22].

Bei anderen Pestiziden bzw. Insektiziden-Synergisten konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie den Hedgehog-Signalweg hemmen. Dies führt zu Störungen neurologischer Entwicklung und könnte daher eine Erklärung für die Veränderung der kranialen Nerven sein [36] [53]. Ob Neonicotinoide ebenfalls Einfluss auf diesen Signalweg haben ist noch nicht bekannt.

Knorpel und Hirnnerven sind Derivate der Neuralleistenzellen [8]. Zur Beurteilung, ob auf molekularer Ebene bereits Veränderungen zu erkennen sind, wurden die Markergene *egr2* und *twist* in Stadium 23 untersucht. Hier konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Bei einer Studie von Wang *et al.* wurde ebenfalls die Expression von Neuralleistenzellen-assoziierten Markern (*HNK-1; pax7, Ap-2α*) in Hühnerembryonen untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion der Neuralleistenzellen bei den mit Imidacloprid behandelten Embryonen. Die Diskrepanz zwischen der hier vorliegenden Arbeit und der Studie von Wang *et al.* könnte möglicherweise durch die unterschiedlichen Modellorganismen und Markergene sowie der unterschiedlichen

Substanz erklärt werden. Zudem befanden sich die Embryonen in niedrigeren Stadien (4-11) nach einer Inkubationszeit von 20 bzw. 42 Stunden [52]. Bereits nachgewiesen wurde, dass der N-2,2-Difluoroethylrest von Flupyradifuron gegenüber dem Neonicotinoid Imidacloprid eine erhöhte insektizide Aktivität aufwies [22]. Daher ist es möglich, dass Flupyradifuron auf andere Organismen als Insekten unterschiedliche Auswirkungen im Vergleich zu anderen Neonicotiniden haben könnte.

Zur weiteren Untersuchung des Nervensystems wurde eine Markergenanalyse mit *alcam* und *sox3* in Stadium 32 durchgeführt. Diese zeigten mögliche Veränderungen der Plakoden. Plakoden bilden zusammen mit Neuralleistenzellen das periphere Nervensystem und stammen vermutlich aus einem gemeinsamen panplakodalen Primordium um die Neuralplatte [43]. Sie können als Verdickungen im gesamten Kopfbereich identifiziert werden [8]. Aufgrund ihrer Position im Embryo können die Plakoden in dorsolaterale Plakoden, die sich neben dem zentralen Nervensystem bilden, und in epibranchiale Plakoden, die zwischen den Branchialbögen liegen, unt[10]hieden werden [10] [3]. Die epibranchialen Plakoden tragen zu den Ganglien des *N. facialis, N. glossopharyngeus* und *N. vagus* bei und werden von den Markergenen *alcam* und *sox 3* angefärbt [44]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Tendenz zur abnormalen Expression der Markergene *alcam* und *sox3* gesehen, weshalb eine quantitative Analyse durch Messung der Länge der durch *sox3* angefärbten Plakoden durchgeführt wurde. Diese ergab eine signifikante Verkürzung der Plakoden IX und X, welche die Ganglien *des N. glossopharyneus* und *N. vagus* betreffen [44]. Unter Ganglien versteht man eine Anhäufung von Nervenzellkörpern. Daher sind die Ergebnisse des *N. glossopharyngeus*, dessen Ausmessung keine signifikante Änderung ergab, dennoch kompatibel mit der Verkürzung der Plakode IX, da möglicherweise nur die Anzahl der Nervenzellen verringert, nicht jedoch deren Länge verändert ist.

4.2.5 Einfluss von Flupyradifuron auf die Herzentwicklung der Embryonen von *X. laevis*

Da das Herz eines der wichtigsten Organe des *X. laevis* ist, wurden Herzen isoliert und vermessen. Hier zeigte sich eine signifikante Vergrößerung ab einer Exposition mit 50 mg/l Flupyradifuron. Zur genaueren Untersuchung dieses Ergebnisses wurde anschließend eine Herzantikörperfärbung mit Cardiac Troponin T (tnnt2) durchgeführt, um dann die nicht präparierten Embryonen fotografieren und beurteilen zu können. Hier bestätigten sich die Ergebnisse des vorangegangenen Experiments. Veränderungen der anatomischen Form des Herzens nach Exposition mit Flupyradifuron wurden bereits von Zhong *et al.* in einer Studie am Zebrafisch *Danio rerio* festgestellt. Es zeigten sich ein verlängerter Herzbeutel, eine Vergrößerung des Atrium-Ventrikel-Abstandes sowie eine Veränderung des Herzschlauches [57]. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Einfluss von Neonicotinoide ähnlich der eines endokrinen Wirkstoffs ist und damit Entwicklungsprozesse beeinträchtigen kann, was zu Malformationen führen könnte [1]. Um die Funktion des Herzens beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit anschließend die Herzfrequenz der Embryonen gemessen. Diese ergab keine signifikanten Veränderungen. Insgesamt war die Varianz der Ergebnisse sehr hoch, was auf Herzrhythmusstörungen hindeuten könnte. Da wie oben beschrieben möglicherweise ein Einfluss auf den Parasympathikus besteht und dieser nachweislich an der Herzfrequenz beteiligt ist, wäre dies eine Erklärung für die vorliegende breite Varianz der Herzfrequenz.

Zur Überprüfung, ob Flupyradifuron Auswirkungen auf molekularer Ebene hinsichtlich der Herzentwicklung hat, wurde in Stadium 20 eine Markergenanalyse von *isl1* und *nkx2.5* sowie in Stadium 28 von *mhcα, nkx2.5* und *actc1* durchgeführt. In keinen der beiden Stadien konnten signifikante Veränderungen festgestellt werden, weshalb anzunehmen ist, dass Flupyradifuron keinen Einfluss auf molekularer Ebene hat, was die Hypothese stützt, dass Flupyradifuron eventuell durch Einfluss auf das vegetative Nervensystem die Herzentwicklung der Embryonen von *X. laevis* verändert. Die oben genannten Ergebnisse wurden zudem durch die Auswertung der Intensitäts- und Flächenmessung unterstützt, die ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zeigte.

4.3 Vergleich der Neonicotinoide Thiamethoxam und Flupyradifuron

Obwohl Thiamethoxam und Flupyradifuron die gleiche Wirkungsweise auf den nAChR haben, zeigen sie doch bei den Parametern, die bei beiden Stoffen untersucht wurden, unterschiedliche Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung der Embryonen von *X. laevis* [34] [39]. Während Thiamethoxam zu einer signifikant verlängerten Körpergröße, einer erhöhten Mobilität ab 100 mg/l und einer Vergrößerung des Kopfes ab 50 mg/l sowie einer Steigerung der Herzfrequenz führte, zeigte Flupyradifuron bei diesen Parametern das Gegenteil bzw. keine Signifikanz der Herzfrequenz. Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Einflüsse könnte auf die veränderte chemische Struktur zurückzuführen sein, weshalb Flupyradifuron auch als Butenolid bezeichnet wird. Es enthält im Gegensatz zu den bisherigen Neonicotinoiden ein verändertes Pharmakorsystem als bioaktives Gerüst mit einer Dihydrofuran-2-on-Gruppe (Abb. 5) [2].

Ähnliche Auswirkungen von Flupyradifuron und Thiamethoxam konnten beispielsweise hinsichtlich der Mortalität gezeigt werden. Eine mögliche Begründung hierfür ist der stickstoffhaltige Heterocyclus, den sowohl Flupyradifuron als auch Thiamethoxam haben [2].

4.4 Relevanz der Studie

Der Einsatz von Pestiziden steigt durch Zunahme der Industrialisierung in der Landwirtschaft sowie durch den Verzicht auf Fruchtfolgen und stellt eine Bedrohung für das Ökosystem dar [11] [55]. Sie können besipielsweise durch Oberflächenabfluss und Ableitung in angrenzende Gräben ins Grundwasser gelangen und so Einflüsse auf Nichtzielorganismen wie Amphibien haben. Die Thematik der hier vorliegenden Arbeit ist daher aktuell.

Durch Versuche in der hier vorliegenden Arbeit konnten bereits ab einer Inkubation mit 1 mg/l Thiamethoxam bzw. 0,1 mg/l Flupyradifuron Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung von *X. laevis* als Modellorganismus gezeigt werden. In bereits

veröffentlichten Studien konnten ähnliche Konzentrationsbereiche in der Natur nachgewiesen werden. So wurde in den Niederlanden 0,41 mg/l Thiamethoxam und in Kanada 2,2 mg/l Thiamethoxam in Oberflächengewässern detektiert [45] [7]. Für Flupyradifuron sollte eine Detektion hinsichtlich des Vorkommens in der Natur durchgeführt werden, da bisher noch keine Daten zu diesem Insektizid vorliegen. Außerdem muss beachtet werden, dass die für Studien entnommenen Proben, die das Vorkommen von niedrigen Konzentrationen bereits bewiesen haben, nicht direkt nach Benutzung der Insektizide entnommen wurden. Es wäre also möglich, dass durchaus höhere Konzentrationen auf Nicht-Ziel-Organismen wirken und größere Effekte erzielen, genauso wie eine mehrmalige Exposition mit Pestiziden, weshalb auch die Auswirkungen höherer Konzentrationen in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Hohe Konzentrationen können zudem Pestizidunfälle oder unsachgemäßen Gebrauch widerspiegeln.

Des Weiteren wurde in der hier vorliegenden Studie nur eine begrenzte Anzahl von Strukturen des *X. laevis* untersucht. Denkbar wäre daher, dass bereits bei niedrigeren Konzentrationen Effekte auf andere Organe etc. vorkommen.

Der *X. laevis gilt* als sehr robust, weshalb er als Modellorganismus für Untersuchungen der Embryogenese verwendet wird. Bei anderen Organismen besteht daher die Möglichkeit von größeren Auswirkungen. Die Versuche wurden zudem in der hier vorliegenden Arbeit unter Laborbedingungen durchgeführt. In der Natur sind die Organismen deutlich mehr Stressoren ausgesetzt und könnten daher empfindlicher gegenüber Insektiziden sein [27] [15].

Anhand der hier aufgeführten Punkte und der gezeigten Auswirkungen trägt die vorliegende Arbeit zur Aufklärung hinsichtlich der Notwendigkeit zum bedachten Einsatz von Insektiziden bei und zeigt, dass auch in Zukunft die Verwendung von Insektiziden nur unter Monitoring stattfinden sollte.

5. Zusammenfassung

Thiamethoxam und Flupyradifuron sind Insektizide die, auf den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) wirken und so die Weiterleitung von Impulsen im Nervensystem stören. Da Pestizide über Luft, Boden und Wasser unkontrolliert in der Natur verteilt werden können, stellen sie eine Bedrohung für das Ökosystem und für Nichtziel-Organismen dar. Insgesamt ist die Studienlage, gerade was aquatische Organismen betrifft, schwach.

Ziel dieser Studie war es die Auswirkungen von Thiamethoxam und Flupyradifuron auf die embryonale Entwicklung von *Xenopus laevis* (*X. laevis*) als Modellorganismus zu untersuchen. Hierfür wurden, wie auch in bereits veröffentlichten Studien, Konzentrationen verwendet, deren Vorkommen in der Natur bereits nachgewiesen wurden bzw. hohe Konzentrationen, welche Pestizidunfälle oder unsachgemäßen Gebrauch widerspiegeln. Gerade in Ländern, in denen wenig Aufklärung bezüglich der Verwendung von Pestiziden und davon ausgehenden Gefahren stattfindet, sind Pestizide immer wieder Ursache von schweren gesundheitlichen Problemen bis hin zu Todesfällen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Thiamethoxam auf den äußeren Phänotyp untersucht. Es wurden Körperlänge, Kopf- und Augenbereich sowie die Mobilität und Herzfunktion untersucht. Dafür wurden die Embryonen mit verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1 10, 50 und 100 mg/l) von Thiamethoxam inkubiert.

Zur Überprüfung, welche Auswirkungen Flupyradifuron auf die Organe der Embryonen von *X. laevis* haben, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Es konnten Veränderungen der Körperlänge, des Kopfes, der Hirnnerven und des Herzens nachgewiesen werden. Insbesondere wurde eine signifikante Vergrößerung des Herzens ab einer Exposition von 50 mg/l Flupyradifuron gezeigt. Außerdem wurden signifikante Veränderungen der Mobilität festgestellt.

Obwohl Thiamethoxam und Flupyradifuron die gleiche Wirkungsweise auf den nAChR haben, ist aus der hier vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass sie unterschiedliche Auswirkungen auf die Embryogenese von *X. laevis* haben. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche chemische Struktur sein, weshalb Flupyradifuron auch als Butenolid bezeichnet wird.

Die Auswirkungen auf die Embryogenese von *X. laevis*, die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten, unterstützen die eingeschränkte Verwendung von Thiamethoxam und Flupyradifuron. Nach einem Gerichtsurteil der Europäischen Kommission sind diese Insektizide in Deutschland nur noch für Gewächshäuser zugelassen und es besteht ein Verbot für die Verwendung auf dem offenen Feld. Ich empfehle aufgrund der erwiesenen Auswirkungen weltweit eine eingeschränkte Verwendung der beiden Neonicotinoide, um die natürlichen Lebensräume und die Nichtziel-Organismen zu schützen und damit eine gesunde Ernährung der Menschen sowie eine artgerechte Haltung zu gewährleisten.

6. Literaturverzeichnis

1. Baines D, Wilton E, Pawluk A, de Gorter M, Chomistek N: Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. Scientific reports, 7: 1-18(2017)

2. Bass C, Field L M: Neonicotinoids. Current biology, 28: 772-773(2018)

3. Begbie J, Brunet J, Rubenstein J L R, Graham A: Induction of the epibranchial placodes. The Company of Biologists, 126: 895-902(1999)

4. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2018/2018_08_22_Fa_Widerruf_Neonikotinoide.html. 07.01., 2022-last update. Available: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2018/2018_08_22_Fa_Widerruf_Neonikotinoide.html

5. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2020/2020_12_17_Fa_Notfallzulassungen_Cruiser_600_FS_NI.html. 07.01., 2022-last update. Available: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/04_pflanzenschutzmittel/2020/2020_12_17_Fa_Notfallzulassungen_Cruiser_600_FS_NI.html.

6. Casida J E: Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. Annual Review of Entomology, 63: 125-44(2018)

7. Chrétien F, Giroux I, Thériault G, Gagnon P, Corriveau J: Surface runoff and subsurface tile drain losses of neonicotinoids and companion herbicides at edge-of-field. Environmental pollution (1987), 224: 255-264(2017)

8. Crane J F, Trainor P A: Neural Crest Stem and Progenitor Cells. Annual review of cell and developmental biology, 22: 267-286(2006)

9. Crane M, Newman M C: What level of effect is a no observed effect? Environmental toxicology and chemistry, 19: 516-519(2000)

10. De Couck M, Nijs J, Girdon Y: You may need a nerve to treat pain: the neuroiological rationale for vagal nerve activation in pain managment. Clin J Pain, 30: 1099-1105(2014)

11. Ecobichon D J: Our changing perspectives on benefits and risks of pesticides: a historical overview. Neurotoxicology, 21: 211-218(2000)

12. Ensley S M: Neonicotinoids. Veterinary Toxicology (Third Edition), 521-524(2018)

13. European Food Safety Authority: Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flupyradifurone. EFSA journal, 13: 1-106(2015)

14. Finnegan M C, Baxter L R, Maul J D, Hanson M L, Hoekstra P F: Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. Environmental toxicology and chemistry, 36: 2838-2848(2017)

15. Flach H, Lenz A, Pfeffer S, Kühl M, Kühl S J: Impact of glyphosate-based herbicide on early embryonic development of the amphibian Xenopus laevis. Elsevier BV(2022)

16. Garriock R J, Meadows S A, Krieg P A: Developmental Expression and Comparative Genomic Analysis of Xenopus Cardiac Myosin Heavy Chain Genes. Developmental Dynamics 233, 1287-93(2005)

17. Gauglitz S, Pflüger H J: Cholinergic transmission via central synapses in the locust nervous system. Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology, 187: 825-836(2001)

18. Gobeli A, Crossley D, Johnson J, Reyna K: The effects of neonicotinoid exposure on embryonic development and organ mass in northern bobwhite quail (Colinus virginianus). Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology, 195: 9-15(2017)

19. Guo Y, Diao Q, Dai P, Wang Q, Hou C, Liu Y, Zhang L, Luo Q, Wu Y, Gao J: The Effects of Exposure to Flupyradifurone on Survival, Development, and Foraging Activity of Honey Bees (Apis mellifera L.) under Field Conditions. Insects, 12: 1-11(2021)

20. Hesselbach H, Scheiner R: The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. Ecotoxicology, 28: 354-366(2019)

21. Hesselbach H, Scheiner R: Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. Scientific reports, 8: 4954-8(2018)

22. Jeschke P, Nauen R, Gutbrod O, Beck M E, Matthiesen S, Haas M, Velten R: Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophore: Structural considerations. Pesticide biochemistry and physiology, 121: 31-38(2015)

23. Kuehl M, Gessert S: Die drei Keimblätter und deren Derivate: Xenopus laevis als Modellsystem. Entwicklungsbiologie, Eugen Ulmer Verlag, S. 44-70 (2010)

24. Kuehl M, Gessert S: Morphogenese: Gastrulation und Neurulation. Entwicklungsbiologie, Eugen Ulmer Verlag, S. 92-111 (2010)

25. Kuehl M, Gessert S: Neurale Musterung. Entwicklungsbiologie, Eugen Ulmer Verlag, S. 157-190 (2010)

26. Lalonde B, Garron C: Temporal and Spatial Analysis of Surface Water Pesticide Occurrences in the Maritime Region of Canada. Arch Environ Contam Toxicol, 79: 12-22(2020)

27. 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 research, 201: 117-262(2021)

28. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P: Oxidative stress, aging, and diseases. CIA, Volume13: 757-772(2018)

29. Liu M, Wang G, Zhang S, Zhong S, Qi G, Wang C, Chuai M, Lee K K H, Lu D, Yang X: From the Cover: Exposing Imidacloprid Interferes With Neurogenesis Through Impacting on Chick Neural Tube Cell Survival. Toxicological sciences, 153: 137-148(2016)

30. Liu X, Zhang Q, Li S, Mi P, Chen D, Zhao X, Feng X: Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (Danio rerio): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. Chemosphere, 199: 16-25(2018)

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. Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, Widmer H: Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. Pest Management Science, 55: 906-913(2001)

33. Matsuda K, Ihara M, Sattelle D B: Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 60: 241-55(2020)

34. Nauen R, Jeschke P, Velten R, Beck M E, Ebbinghaus-Kintscher U, Thielert W, Wölfel K, Haas M, Kunz K, Raupach G: Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. Pest management science, 71: 850-862(2015)

35. Nistor N, Frasinariu O, Streangă V: Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticide. Poisoning - From Specific Toxic Agents to Novel Rapid and Simplified Techniques for Analysis, IntechOpen, S. 107-123 (2017)

36. Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López S L, Carrasco A E: Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. Chemical research in toxicology, 23: 1586-1595(2010)

37. Pai V P, Aw S, Shomrat T, Lemire J M, Levin M: Transmembrane voltage potential controls embryonic eye patterning in Xenopus laevis. Development, 139: 313-323(2012)

38. Peillex C, Pelletier M: The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. Journal of Immunotoxicology, 17: 163-174(2020)

39. Pesticide Research Institute: https://www.pesticideresearch.com/site/2015/02/05/flupyradifurone-a-new-insecticide-or-just-another-neonicotinoid/. 07.01., 2022-last update. Available: https://www.pesticideresearch.com/site/2015/02/05/flupyradifurone-a-new-insecticide-or-just-another-neonicotinoid

40. Pickford D B, Finnegan M C, Baxter L R, Böhmer W, Hanson M L, Stegger P, Hommen U, Hoekstra P F, Hamer M: Response of the mayfly (Cloeon dipterum) to chronic exposure to thiamethoxam in outdoor mesocosms. Environmental toxicology and chemistry, 37: 1040-1050(2018)

41. Registration Report Federal Republic of Germany: Sivanto, 1-27(2020)

42. Rodrigues K J A, Santana M B, Do Nascimento J L M, Picanço-Diniz D L W, Maués L A L, Santos S N, Ferreira V M M, Alfonso M, Durán R, Faro L R F: Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. Ecotoxicology and environmental safety, 73: 101-107(2010)

43. Schlosser G: Induction and specification of cranial placodes. Developmental biology, 294: 303-351(2006)

44. Schlosser G, Northcutt R G: Development of neurogenic placodes in Xenopus laevis. Journal of Comparative Neurology, 418: 121-146(2000)

45. Sjerps R M A, Kooij P J F, van Loon A, Van Wezel A P: Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources. Chemosphere (Oxford), 235: 510-518(2019)

46. Smith H A, Nagle C A, MacVean C A, McKenzie C L: Susceptibility of Bemisia tabaci MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) to Imidacloprid, Thiamethoxam, Dinotefuran and Flupyradifurone in South Florida. Insects, 7: 1-12(2016)

47. Thompson H, Coulson M, Ruddle N, Wilkins S, Harkin S: Thiamethoxam: Assessing flight activity of honeybees foraging on treated oilseed rape using radio frequency identification technology. Environmental toxicology and chemistry, 35: 385-393(2016)

48. Tišler T, Jemec A, Mozetič B, Trebše P: Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. Chemosphere (Oxford), 76: 907-914(2009)

49. Tomizawa M, Casida J E: Molecular Recognition of Neonicotinoid Insecticides: The Determinants of Life or Death. Accounts of chemical research, 42: 260-269(2009)

50. Tomizawa M, Lee D L, Casida J E: Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect versus Mammalian Nicotinic Receptors. Journal of agricultural and food chemistry, 48: 6016-6024(2000)

51. U.S. Enviromental Protection Agency,Office of Pesticide Programs Registration, Division: SIVANTO™ 200 SL. 1-23 (2015)

52. 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. Journal of agricultural and food chemistry, 64: 4705-4715(2016)

53. Wang J, Lu J, Mook J, Robert A, Zhang M, Zhao S, Barak L S, Freedman J H, Lyerly H K, Chen W: The insecticide synergist piperonyl butoxide inhibits hedgehog signaling: Assessing chemical risks. Toxicological sciences, 128: 517-523(2012)

54. Warkman A S, Krieg P A: Xenopus as a model system for vertebrate heart development. Seminars in cell & developmental biology, 18: 46-53(2007)

55. Yadav H, Sankhla M S, Kumar R: Pesticides-induced carcinogenic & neurotoxic effect on human. Forensic Research & Criminology International Journal, 7: 243-245(2019)

56. Yan L J: Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. Redox Biology, 2: 165-169(2014)

57. Zhong K, Meng Y, Wu J, Wei Y, Huang Y, Ma J, Lu H: Effect of flupyradifurone on zebrafish embryonic development. Environmental pollution (1987), 285: 117-323(2021)

Danksagung

Es ist mir ein großes Anliegen, all jenen zu danken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu aller erst möchte ich PD Dr. Susanne Kühl danken, in deren Arbeitsgruppe ich meine Doktorarbeit machen konnte. Sie hat mich hervorragend unterstützt und trug in besonderem Maße zum Gelingen meiner Promotion bei.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Hannah Flach. Mit viel Geduld zeigte sie mir alle experimentellen Methoden und unterstütze zudem meinen Schreibprozess. Sie hatte immer ein offenes Ohr und wusste für jedes Problem eine Lösung.

Die strukturierten Protokolle zu sämtlichen Methoden von Petra Dietmann erleichterten die Laborarbeit enorm. Auch sie unterstützte mich bei Durchführungen von Experimenten.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Studenten, die mir die Zeit im Labor unvergesslich machen.

Lebenslauf

Persönliches

Name	Julia Susanne Schneider
Geboren	1996 in Passau

Schule, Freiwilliges Soziales Jahr

2002 – 2006	Bibris-Grundschule, Herbrechtingen
2006 – 2009	Buigen-Gymnasium, Herbrechtingen
2009 – 2014	Schiller-Gymnasium, Heidenheim
27.05.2014	Allgemeine Hochschulreife
09/2014 – 08/2015	Freiwilliges Soziales Jahr im Klinikum Heidenheim

Studium und Promotion

04/2016 – 06/2021	Studium der Zahnmedizin an der Universität Ulm
27.09.2018	Zahnärztliche Vorprüfung
09.06.2021	Zahnärztliche Prüfung
13.08.2021	Erhalt der Approbation
07/2021 – 12/2021	Experimentelle Doktorarbeit; Arbeitsgruppe PD Dr. Susanne Kühl; Institut für Biochemie und Molekulare Biologie; Universität Ulm
20.04.2023	Promotionskolloquium