

## Projektbericht:

# Fischzellinientest zur Bestimmung der Toxizität von Wasserproben aus dem Furtbach

## Übersichtsreport:

- Wasserproben vom 28.05.2019
- Wasserproben vom 12.06.2019
- Wasserproben vom 25.06.2019
- Wasserproben vom 09.07.2019
- Wasserproben vom 17.09.2019

## AWEL Projekt-Nr.: 85P-1511

Kunde:	AWEL Dr. Pius Niederhauser Sektionsleiter Hardturmstrasse 105 CH-8090 Zürich
Firma:	aQuaTox-Solutions GmbH Im Langacker 6, CH-8304 Wallisellen Tel. +41 (0)76 778 12 80 <a href="mailto:stephan.fischer@aquatox-solutions.ch">stephan.fischer@aquatox-solutions.ch</a> <a href="http://www.aquatox-solutions.ch">www.aquatox-solutions.ch</a>
Projektleiter:	Dr. Stephan Fischer
Projektleiter-Stv.:	Prof. Dr. Kristin Schirmer
Projektdurchführende:	Melanie Fischer Dr. Stephan Fischer
Datum:	23.07.2020



## Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war die Bestimmung des toxischen Potenzials von Wasserproben aus dem Furtbach (Kanton Zürich). Dafür wurden über das Jahr 2019 verteilt fünf Wasserproben von vier verschiedenen Abschnitten und einmalig von fünf Seitenbächen des Furtbaches untersucht (Wasserprobenübersicht Tabelle 1).

Tabelle 1. Übersicht untersuchte Wasserproben Furtbach 2019

Wasserproben 2019	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwieskanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15				Mischprobe					
W 20/21	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Mischprobe					
W 22/23	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Mischprobe					
W 24/25	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Mischprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe
W 26/27	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Mischprobe					
W 36/37	Sammelprobe	Sammelprobe	Sammelprobe	Mischprobe					

Alle Wasserproben wurden mittels dem Fischzelllinien-Test RTgill-WI-ISO21115 (Kiemenzellen der Regenbogenforelle) auf ihre akute Fischtoxizität getestet. Zusätzlich wurden subletale Effekte; 1) Biotransformation von organischen Schadstoffverbindungen, 2) allgemeiner Umweltstress, 3) Effekte auf das Fischimmunsystem, 4) Schwermetallbelastung, 5) Glukokortikoidbelastung, 6) Oxidativer-Stress, 7) Neurotoxizität, 8) endokrine Effekte und 9) Apoptose in den RTgill-WI Zellen mittels Genexpressionsanalyse untersucht.

Die Ergebnisse des RTgill-WI-Tests zeigten das vier Wasserproben vom Standort Würenlos eine leicht bis stark akut toxische Wirkung in den Fischzellen hervorriefen. Für alle Proben von den weiteren Standorten konnten keine akut toxischen Effekte in den Zellen gemessen werden. Dieses Resultat deutet auf eine höhere Schadstoffbelastung und somit auf ein erhöhtes Gesundheitsrisiko für Fische am Standort Würenlos hin.

Die Resultate der Genexpressionsanalyse von allen untersuchten Wasserproben, zeigten das generell die stärksten subletalen Effekte in den Fischzellen nach Exposition mit Wasserproben vom Standort Würenlos hervorgerufen wurden, gefolgt von Buchs, Regensdorf und Trockenloo. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der akuten Fischtoxizität (siehe Abb. 1).

Des Weiteren ist aus dieser Studie erkennbar das die dominierenden subletalen Effekte, in Betrachtung aller untersuchten Wasserproben (siehe Abb. 1), vor allem die Belastung mit organischen Schadstoffverbindungen (Biotransformation), mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit (Immunantwort) und Metallbelastung waren. Dahingegen scheinen allgemeiner Umweltstress, endokrine Wirkung, Apoptose, Neurotoxizität und Glukokordikoidbelastung einen geringeren Einfluss am Furtbach zu haben.



In der folgenden Abbildung sind alle Ergebnisse (Untersuchung von fünf Wasserproben, siehe Tabelle 1) hinsichtlich der akuten Toxizität und subletalen Effekten, als Übersichtsgrafik zusammengefasst.

Endpunkte	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos
Akute Toxizität				
Biotransformation				
Immunantwort				
Metallstress				
Allgemeiner Stress				
Endokrine Wirkung				
Apoptose				
Neurotoxizität				
Glukokortikoidbelastung				
<b>Effektsumme</b>	<b>264</b>	<b>330</b>	<b>352</b>	<b>590</b>

Effekte			
kein	leicht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 1. Zusammenfassung der Ergebnisse für die Untersuchungen zur akuten Toxizität und subletalen Effekten von den Furtbachstandorten Trockenloo, Regensdorf, Buchs und Würenlos. Die Probe W15 Würenlos und die einmalig getesteten Seitenbäche sind nicht mit einbezogen, da nur ein Zeitpunkt untersucht wurde. Des Weiteren ist eine Effektsumme dargestellt um die Belastung an den einzelnen Standorten besser zu verdeutlichen. Die Effektsumme wurde aus den Einzelwerten von allen untersuchten Endpunkten berechnet.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>GEGENSTAND DES PROJEKTES</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>HAFTUNGS AUSSCHLUSS</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>ERHALTENE WASSERPROBEN</b>	<b>2</b>
3.1	Proben W 20/21 28.05.2019	2
3.2	Proben W 22/23 12.06.2019	3
3.3	Proben W 24/25 25.06.2019	4
3.4	Proben W 26/27 09.07.2019	5
3.5	Proben W 36/37 17.09.2019	6
<b>4</b>	<b>RTGILL-WI ZELLINIENTEST NACH ISO 21115</b>	<b>7</b>
4.1	Hintergrund	7
4.2	Testkontrollen RTgill-WI Test	7
4.3	Toxikologische Beurteilung der Proben	7
4.4	Ergebnisse	8
4.4.1	Übersicht Ergebnisse akute Toxizität	8
4.4.2	Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 20/21	8
4.4.3	Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 22/23	10
4.4.4	Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 24/25	12
4.4.5	Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 26/27	15
4.4.6	Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 36/37	17
<b>5</b>	<b>SUBLETALE-EFFEKE / GENEXPRESSIONSANALYSE</b>	<b>19</b>
5.1	Hintergrund	19
5.2	Testkontrollen und Auswertung	19
5.3	Biotransformation	20
5.3.1	Zusammenfassung Ergebnisse Biotransformation	20
5.3.2	Markergene	21
5.3.3	Genexpressionsergebnisse Biotransformation	22
5.3.4	Principal Component Analyse (PCA)	25



<b>5.4</b>	<b>Allgemeine Stressantwort</b>	<b>26</b>
5.4.1	Zusammenfassung Ergebnisse allgemeine Stressantwort	26
5.4.2	Markergene	27
5.4.3	Genexpressionsergebnisse allgemeine Stressantwort	28
5.4.4	Principal Component Analyse (PCA)	31
<b>5.5</b>	<b>Zelluläre Immunantwort</b>	<b>32</b>
5.5.1	Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Immunantwort	32
5.5.2	Markergene	33
5.5.3	Genexpressionsergebnisse zelluläre Immunantwort	33
5.5.4	Principal Component Analyse (PCA)	37
<b>5.6</b>	<b>Zelluläre Metallbelastung</b>	<b>38</b>
5.6.1	Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Metallbelastung	38
5.6.2	Markergene	39
5.6.3	Genexpressionsergebnisse Metallbelastung	40
5.6.4	Principal Component Analyse (PCA)	42
<b>5.7</b>	<b>Glukokortikoidbelastung</b>	<b>43</b>
5.7.1	Zusammenfassung Ergebnisse Glukokortikoidbelastung	43
5.7.2	Markergene	44
5.7.3	Genexpressionsergebnisse Glukokortikoidbelastung	44
5.7.4	Principal Component Analyse (PCA)	46
<b>5.8</b>	<b>Oxidativer Stress</b>	<b>47</b>
5.8.1	Zusammenfassung Ergebnisse oxidativer Stress	47
5.8.2	Markergene	48
5.8.3	Genexpressionsergebnisse oxidativer Stress	48
5.8.4	Principal Component Analyse (PCA)	50
<b>5.9</b>	<b>Neurotoxizität</b>	<b>51</b>
5.9.1	Markergene	51
5.9.2	Genexpressionsergebnisse Neurotoxizität	51
<b>5.10</b>	<b>Endokrine Wirkung</b>	<b>53</b>
5.10.1	Markergene	53
5.10.2	Genexpressionsergebnisse endokrine Wirkung	53



5.11	Apoptose (programmierter Zelltod)	55
5.11.1	Markergene	55
5.11.2	Genexpressionsergebnisse Apoptose	55
5.11.3	Principal Component Analyse (PCA) Neurotoxizität, endokrine Wirkung und Apoptose	57
<b>6</b>	<b>ANMERKUNG</b>	<b>58</b>



## 1 GEGENSTAND DES PROJEKTES

Testung von Wasserproben aus verschiedenen Abschnitten des Furtbaches und von fünf Seitenbächen, hinsichtlich ihrer möglichen toxischen Wirkungen (akute Toxizität und Auftreten von subletalen Effekten) auf Fische. Die Wasserproben wurden mittels RTgill-WI ISO 21115 Fischzellinientest und Biomarker-Genexpressionsanalyse untersucht.

## 2 HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Dieser Bericht wurde von der aQuaTox-Solutions GmbH erstellt und ist ausschließlich für den auf der Titelseite genannten Kunden bestimmt. Eine Haftung gegenüber Dritten, die sich auf diesen Bericht stützen, wird ausgeschlossen.



### 3 ERHALTENE WASSERPROBEN

#### 3.1 Proben W 20/21 28.05.2019

Test:	RTgill-WI Zelllinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse RTgill-WI Zelllinie	
Wasserproben:	Lieferant:	AWEL
	Inhalt:	5 X ca. 200 ml Wasserproben
	Lagerung:	4 ± 2 °C
	Probenerhalt:	28.05.2019
Probenbezeichnung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Probe 1: 2019_309 OG 1 Furtbach vor Trockenloo</li> <li>2) Probe 2: 2019_309 OG 2 Furtbach nach ARA Regensdorf</li> <li>3) Probe 3: 2019_309 OG 5 Furtbach nach ARA Buchs</li> <li>4) Probe 4: 2019_188 CH 13 /CH 14 /CH 15 /CH 16 Furtbach bei Würenlos</li> <li>5) <b>Probe 5: 2019_188 CH 4 Furtbach bei Würenlos – eingefrorene Probe von WI5</b></li> </ol>	
Testorganismus:	RTgill-WI Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ))	
Temperatur:	19 ± 1 °C	
Testdurchführung		
RTgill-WI-Test:	28.-29.05.2019	
Genexpressionsanalyse:	29.-31.05.2019	
Test Ort:	Eawag	
	Überlandstrasse 133 /CH-8600 Dübendorf	



### 3.2 Proben W 22/23 12.06.2019

Test:	RTgill-WI Zelllinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse RTgill-WI Zelllinie	
Wasserproben:	Lieferant:	AWEL
	Inhalt:	4 X ca. 200 ml Wasserproben
	Lagerung:	4 ± 2 °C
	Probenerhalt:	12.06.2019
Probenbezeichnung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Probe 1: 2019_339 OG 1 Furtbach vor Trockenloo</li> <li>2) Probe 2: 2019_339 OG 2 Furtbach nach ARA Regensdorf</li> <li>3) Probe 3: 2019_339 OG 5 Furtbach nach ARA Buchs</li> <li>4) Probe 4: 2019_188 CH 17 /CH 18 /CH 19 /CH 20 Furtbach bei Würenlos</li> </ol>	
Testorganismus:	RTgill-WI Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ))	
Temperatur:	19 ± 1 °C	
Testdurchführung		
RTgill-WI-Test:	12.-13.06.2019	
Genexpressionsanalyse:	19.-21.06.2019	
Test Ort:	Eawag	
	Überlandstrasse 133 /CH-8600 Dübendorf	



### 3.3 Proben W 24/25 25.06.2019

Test:	RTgill-WI Zelllinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse RTgill-WI Zelllinie	
Wasserproben:	Lieferant:	AWEL
	Inhalt:	9 X ca. 200 ml Wasserproben
	Lagerung:	4 ± 2 °C
	Probenerhalt:	25.06.2019
Probenbezeichnung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Probe 1: 2019_357 OG 1 Furtbach vor Trockenloo</li> <li>2) Probe 2: 2019_357 OG 2 Furtbach nach ARA Regensdorf</li> <li>3) Probe 3: 2019_357 OG 5 Furtbach nach ARA Buchs</li> <li>4) Probe 4: 2019_188 CH 21 / CH 22 Furtbach bei Würrenlos</li> <li>5) Probe 5: 2019_357 OG 3 Breitiwiesenkanal</li> <li>6) Probe 6: 2019_357 OG 4 Mülibach</li> <li>7) Probe 7: 2019_357 OG 6 Bännengraben</li> <li>8) Probe 8: 2019_357 OG 7 Oberwiesenbach</li> <li>9) Probe 9: 2019_357 OG 8 Harberenbach</li> </ol>	
Testorganismus:	RTgill-WI Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ))	
Temperatur:	19 ± 1 °C	
Testdurchführung		
RTgill-WI-Test:	25.-26.06.2019	
Genexpressionsanalyse:	10.-11.07.2019	
Test Ort:	Eawag Überlandstrasse 133 /CH-8600 Dübendorf	



### 3.4 Proben W 26/27 09.07.2019

Test:	RTgill-WI Zellinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse RTgill-WI Zelllinie	
Wasserproben:	Lieferant:	AWEL
	Inhalt:	4 X ca. 200 ml Wasserproben
	Lagerung:	4 ± 2 °C
	Probenerhalt:	09.07.2019
Probenbezeichnung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Probe 1: 2019_401 OG 1 Furtbach vor Trockenloo</li> <li>2) Probe 2: 2019_401 OG 2 Furtbach nach ARA Regensdorf</li> <li>3) Probe 3: 2019_401 OG 5 Furtbach nach ARA Buchs</li> <li>4) Probe 4: 2019_188 CH 25 /CH 26 Furtbach bei Würenlos</li> </ol>	
Testorganismus:	RTgill-WI Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ))	
Temperatur:	19 ± 1 °C	
Testdurchführung		
RTgill-WI-Test:	09.-10.07.2019	
Genexpressionsanalyse:	16.-17.07.2019	
Test Ort:	Eawag	
	Überlandstrasse 133 /CH-8600 Dübendorf	



### 3.5 Proben W 36/37 17.09.2019

Test:	RTgill-WI Zellinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse RTgill-WI Zelllinie	
Wasserproben:	Lieferant:	AWEL
	Inhalt:	4 X ca. 200 ml Wasserproben
	Lagerung:	4 ± 2 °C
	Probenerhalt:	17.09.2019
Probenbezeichnung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Probe 1: 2019_541 OG 1 Furtbach vor Trockenloo</li> <li>2) Probe 2: 2019_541 OG 2 Furtbach nach ARA Regensdorf</li> <li>3) Probe 3: 2019_541 OG 5 Furtbach nach ARA Buchs</li> <li>4) Probe 4: 2019_461 CH 3 Furtbach bei Würenlos</li> </ol>	
Testorganismus:	RTgill-WI Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle ( <i>Onchorhynchus mykiss</i> ))	
Temperatur:	19 ± 1 °C	
Testdurchführung		
RTgill-WI-Test:	17.-18.09.2019	
Genexpressionsanalyse:	07.-09.10.2019	
Test Ort:	Eawag	
	Überlandstrasse 133 /CH-8600 Dübendorf	



## 4 RTGILL-WI ZELLINIENTEST NACH ISO 21115

### 4.1 Hintergrund

Beim Testen akuter Fischtoxizität kann das Kiemenepithel als primäre Aufnahme- und Angriffsstelle von Wasserverunreinigungen angesehen werden. Ein geschädigtes Kiemenepithel führt zu einer eingeschränkten Funktionsweise des Organismus bis hin zum Tod. Beides spiegelt sich in einer reduzierten Lebensfähigkeit der Zellen wieder, welche im RTgill-WI Zellinientest quantifiziert wird. Die permanente Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) RTgill-WI kann direkt der Wasserprobe ausgesetzt werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen wird mit einer Kombination fluoreszierender Indikatorfarbstoffe ermittelt, welche drei verschiedene Toxizitätsparameter auf demselben Zellsatz nachweisen.

Der Test wird in 24 well-Platten durchgeführt. Es werden bis zu 6 Verdünnungsstufen der Wasserprobe hergestellt. Nach nur 24 Stunden Exposition erfolgt die photometrische Messung der Fluoreszenz der Indikatorfarbstoffe. Dabei werden AlamarBlue, CFDA-AM und Neutral Rot jeweils als Maß für die metabolische Aktivität, die Integrität der Zellmembran und die Integrität der Lysosomen-Membranen verwendet. Die Ergebnisse werden als % Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt.

### 4.2 Testkontrollen RTgill-WI Test

Die Daten wurden wie in der ISO Richtlinie 21115 angegeben ausgewertet. Alle Qualitätskriterien anhand der vorgeschriebenen Kontrollen wurden wie folgt erfüllt:

- Die Wasserproben zeigten keine Eigenfluoreszenz auf. Damit konnte eine Interferenz mit den fluoreszierenden Zellvitalitätsindikatoren ausgeschlossen werden.
- Die parallel durchgeführten Testkontrollen (Positivkontrolle / Standardmedium: Zellen exponiert mit einer Konzentrationsreihe an 3,4-Dichloroanilin in Standardmedium) zeigten Effektkonzentrationen im vorgeschriebenen Bereich.

### 4.3 Toxikologische Beurteilung der Proben

Jede Wasserprobe wurde in zwei Ansätzen getestet:

- In Stufen, von 100% bis 6.25% Wasserprobe, verdünnt mit dem Standardmedium → dient der Bestimmung der Toxizität der Wasserprobe (siehe Abbildungen 3 bis 7, je linke Spalte).
- Unverdünnte Wasserprobe mit Zusatz einer Konzentrationsreihe von 3,4-Dichloroanilin (3,4-DCA - Positivkontrolle / Wasserprobe) → dient als Indikator für eine Wechselwirkung von Chemikalien mit der Matrix der Wasserprobe, d.h.



ob die Matrix einen Chemikalieneffekt verstärkt oder vermindert (siehe Abbildungen 3 bis 7, je rechte Spalte).

## 4.4 Ergebnisse

### 4.4.1 Übersicht Ergebnisse akute Toxizität

Von allen untersuchten Wasserproben zeigten nur die Proben vom Standort Würenlos, W 15, W 22/23, W 26/27 und W 36/37, einen leicht bis stark akut toxischen Effekt auf die RTgill-WI Zellen (siehe Abb. 2.). Alle anderen Wasserproben riefen keine akut toxischen Effekte in den Zellen hervor.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann der Standort Würenlos als generell stärker belastet eingeschätzt werden und weist dementsprechend auf eine leichte bis erhöhte akute Fischtoxizität hin. Alle anderen Standorte können über die gesamte Kampagne als nicht akut fischtoxisch eingestuft werden.

Die stark toxischen Effekte der eingefrorenen Wasserprobe W 15 Würenlos sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die erhöhte Konzentration des Insektizids Chlorpyrifosmethyl (Quelle AWEL intern) in dieser Probe zurückzuführen.

Wasserproben 2019	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitiwiesenskanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesensbach	Harberensbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Akute Toxizität		
Keine	Leicht	Toxisch

Abbildung 2. Übersichtsdiagramm akute Toxizität von allen untersuchten Wasserproben.

### 4.4.2 Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 20/21

Tabelle 2. Auswertung RTgill-WI-Zellinientest der Wasserproben mit Erhalt 28.05.2019

Probe ID	Resultat	Kommentar
1. Trockenloo	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
2. ARA Regensdorf	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
3. ARA Buchs	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
4. Würenlos	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
5. Würenlos – Probe W15	Akut Toxisch	Ab $\geq$ 60% Anteil Wasserprobe



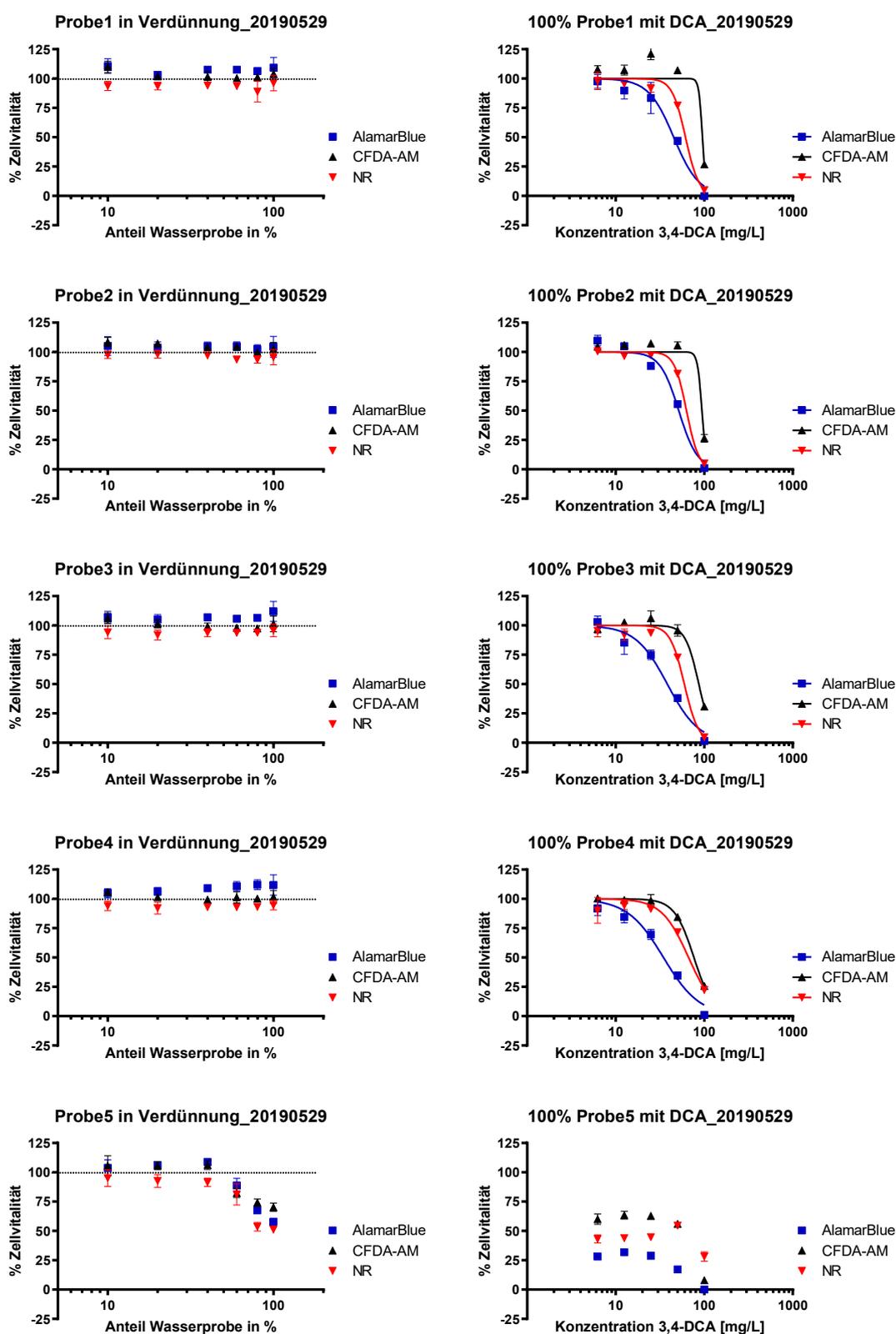


Abbildung 3. Übersicht über die Resultate der Proben mit Erhalt 28.05.2019. Linke Spalte: eigentliche Wasserproben in Verdünnungsstufen; Rechte Spalte: 3,4-DCA Positivkontrolle der Wasserproben. Probe 5 zeigt deutliche Toxizität (unten links) – entsprechend ergibt das 3,4-DCA versetzte Wasser keine Konzentrations-Wirkungskurve (unten rechts).



#### 4.4.3 Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 22/23

Tabelle 3. Auswertung RTgill-WF-Zellinientest der Wasserproben mit Erhalt 12.06.2019

Probe ID	Resultat	Kommentar
1. Trockenloo	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
2. ARA Regensdorf	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
3. ARA Buchs	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
4. Würenlos	Grenzfall / leicht akut toxisch	Erhöhte Variabilität $\geq$ 60% Wasserprobe; leicht verstärkender Matrixeffekt



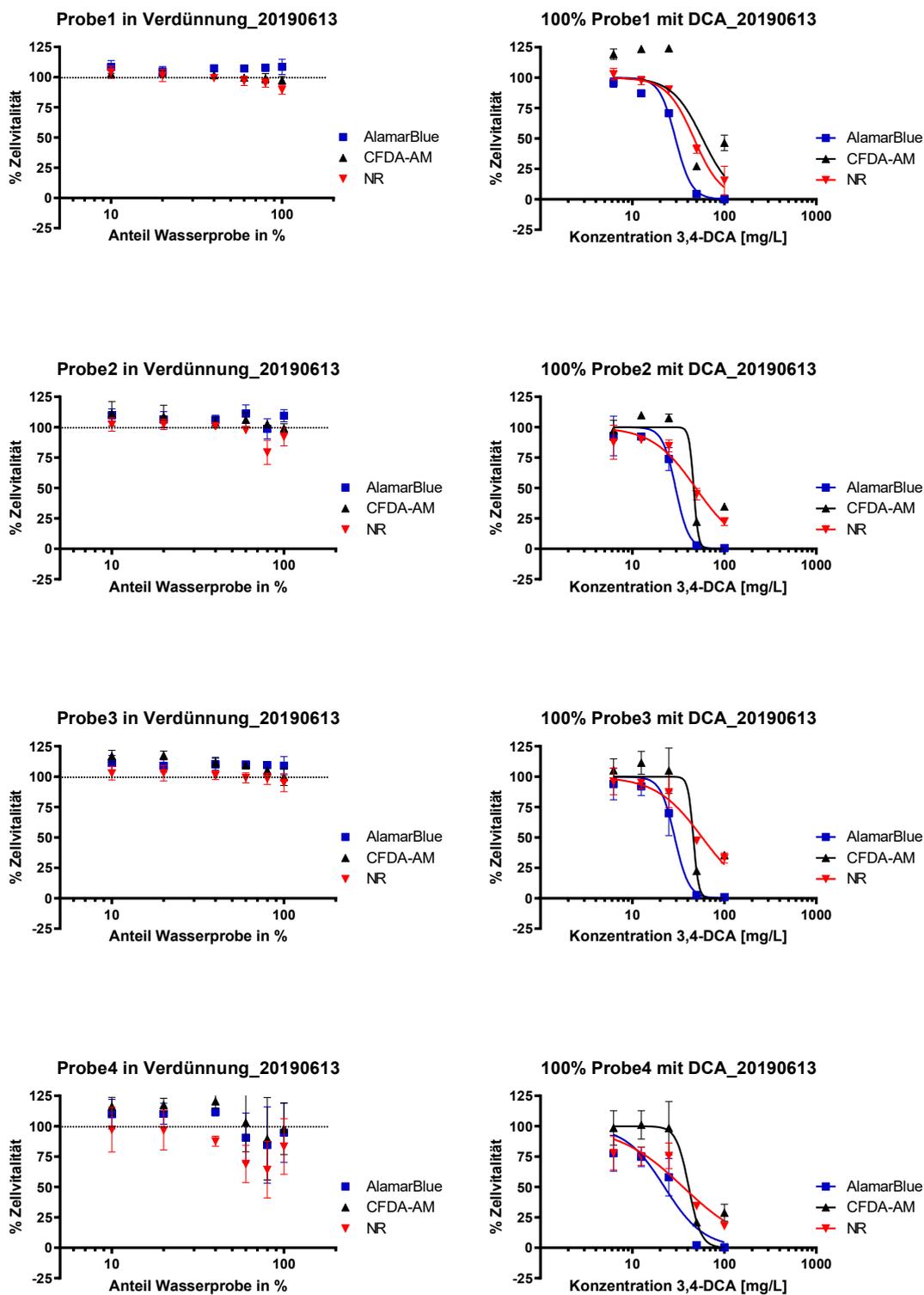


Abbildung 4. Übersicht über die Resultate der Proben mit Erhalt 12.06.2019. Linke Spalte: eigentliche Wasserproben in Verdünnungsstufen; Rechte Spalte: 3,4-DCA Positivkontrolle der Wasserproben. Probe 4 zeigt erhöhte Variabilität ab 60% Wasserprobe (unten links) – in der dazugehörigen 3,4-DCA versetzten Wasserprobe (unten rechts) liegt der aus der Konzentrations-Wirkungskurve für AlamarBlue (metabolische Aktivität) resultierende EC50-Wert (Konzentration bei der die Zellvitalität bei 50% liegt) leicht unterhalb vom Validitätsbereich, was eine leichte Verstärkung der Wirkung von 3,4-DCA durch die Matrix anzeigt.



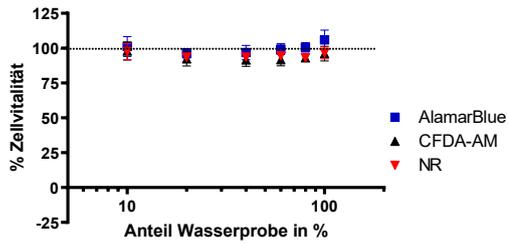
#### 4.4.4 Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 24/25

Tabelle 4. Auswertung RTgill-WF-Zellinientest der Wasserproben mit Erhalt 25.06.2019

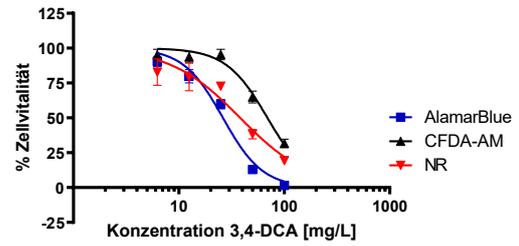
Probe ID	Resultat	Kommentar
1. Trockenloo	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
2. ARA Regensdorf	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
3. ARA Buchs	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
4. Würenlos	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
5. Breitwiesenkanal	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
6. Mülibach	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
7. Bännengraben	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
8. Oberwiesenbach	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
9. Harberenbach	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix



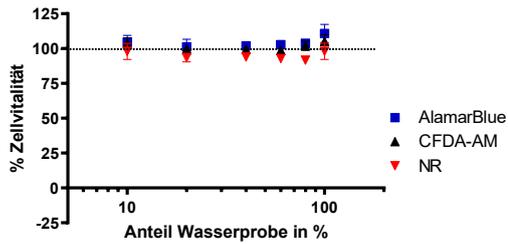
Probe1 in Verdünnung\_20190626



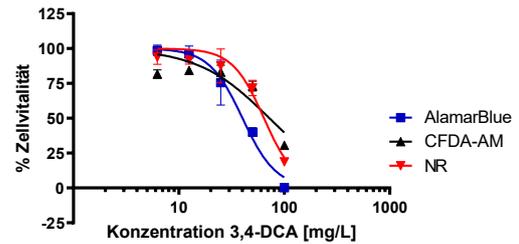
100% Probe1 mit DCA\_20190626



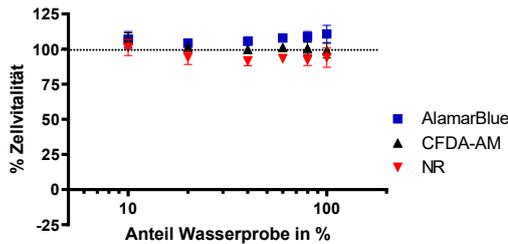
Probe2 in Verdünnung\_20190626



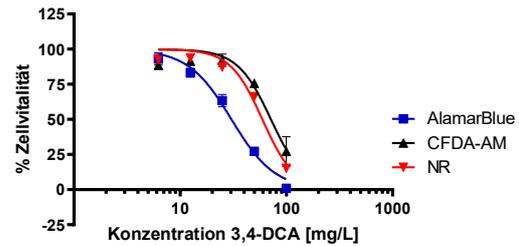
100% Probe2 mit DCA\_20190626



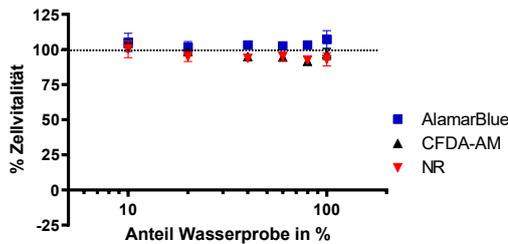
Probe3 in Verdünnung\_20190626



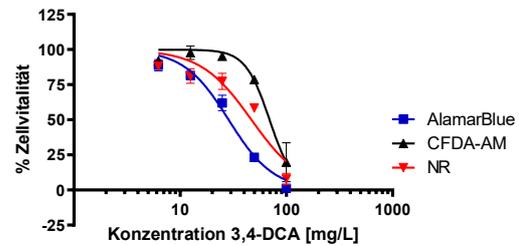
100% Probe3 mit DCA\_20190626



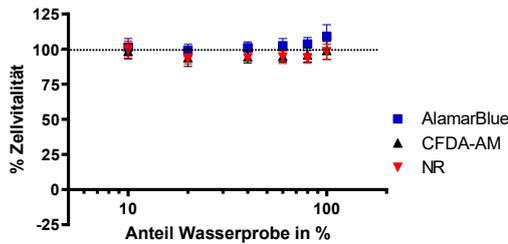
Probe4 in Verdünnung\_20190626



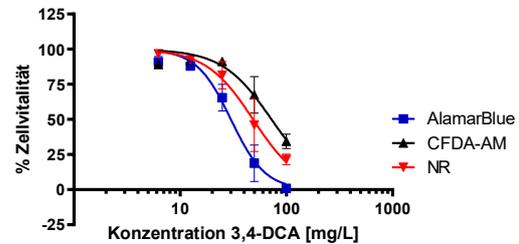
100% Probe4 mit DCA\_20190626



Probe5 in Verdünnung\_20190626



100% Probe5 mit DCA\_20190626



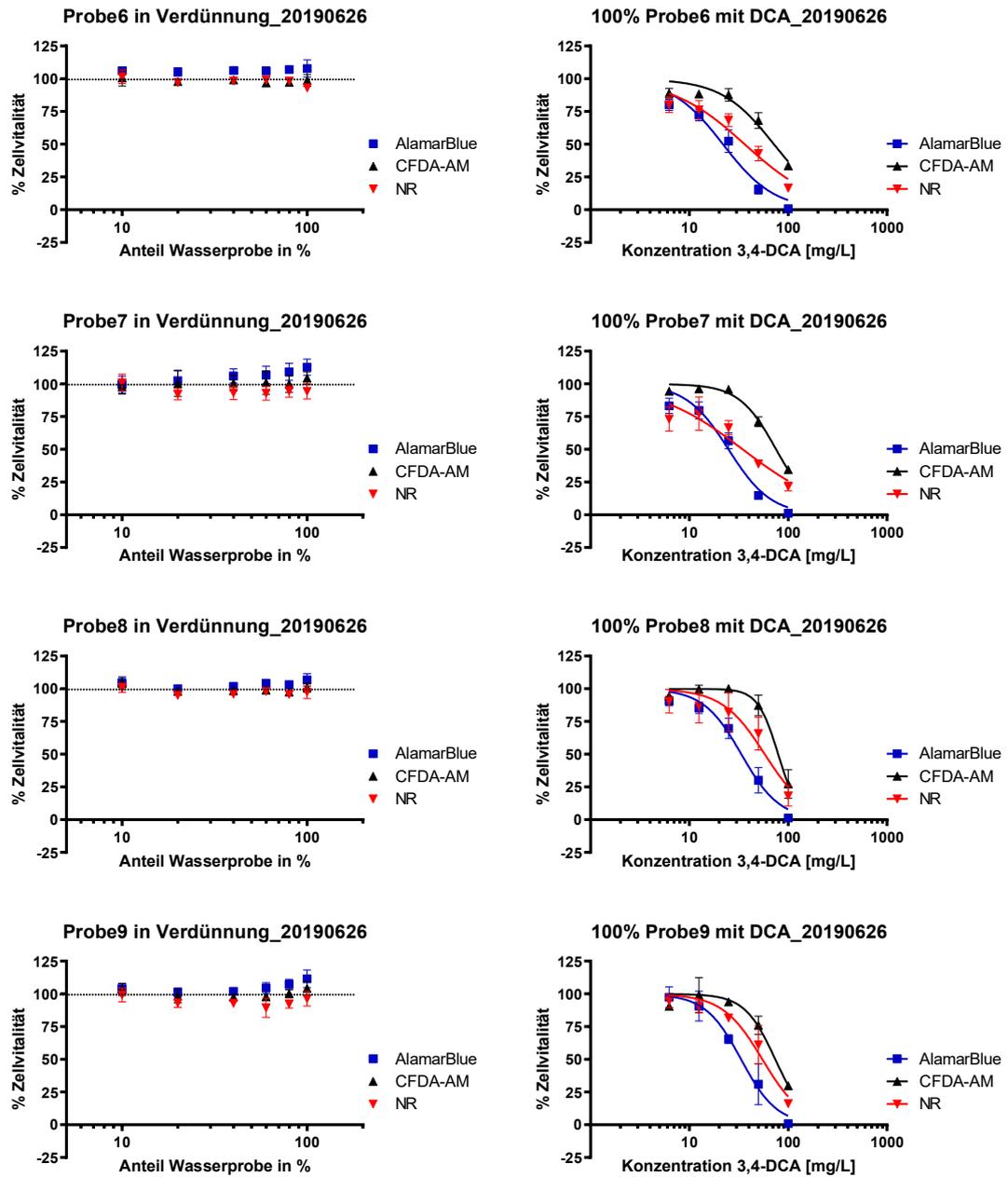


Abbildung 5. Übersicht über die Resultate der Proben mit Erhalt 25.06.2019. Linke Spalte: eigentliche Wasserproben in Verdünnungsstufen; Rechte Spalte: 3,4-DCA Positivkontrolle der Wasserproben.



#### 4.4.5 Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 26/27

Tabelle 5. Auswertung RTgill-WI-Zellinientest der Wasserproben mit Erhalt 09.07.2019

Probe ID	Resultat	Kommentar
1. Trockenloo	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
2. ARA Regensdorf	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
3. ARA Buchs	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
4. Würenlos	Leicht akut toxisch	Ab $\geq$ 60% Wasserprobe für CFDA-AM (Membran- Integrität) und NR (Integrität der Lyso- somen-Membranen); Kein Effekt für Al- marBlue (metabolische Aktivität); kein Ein- fluss der Matrix



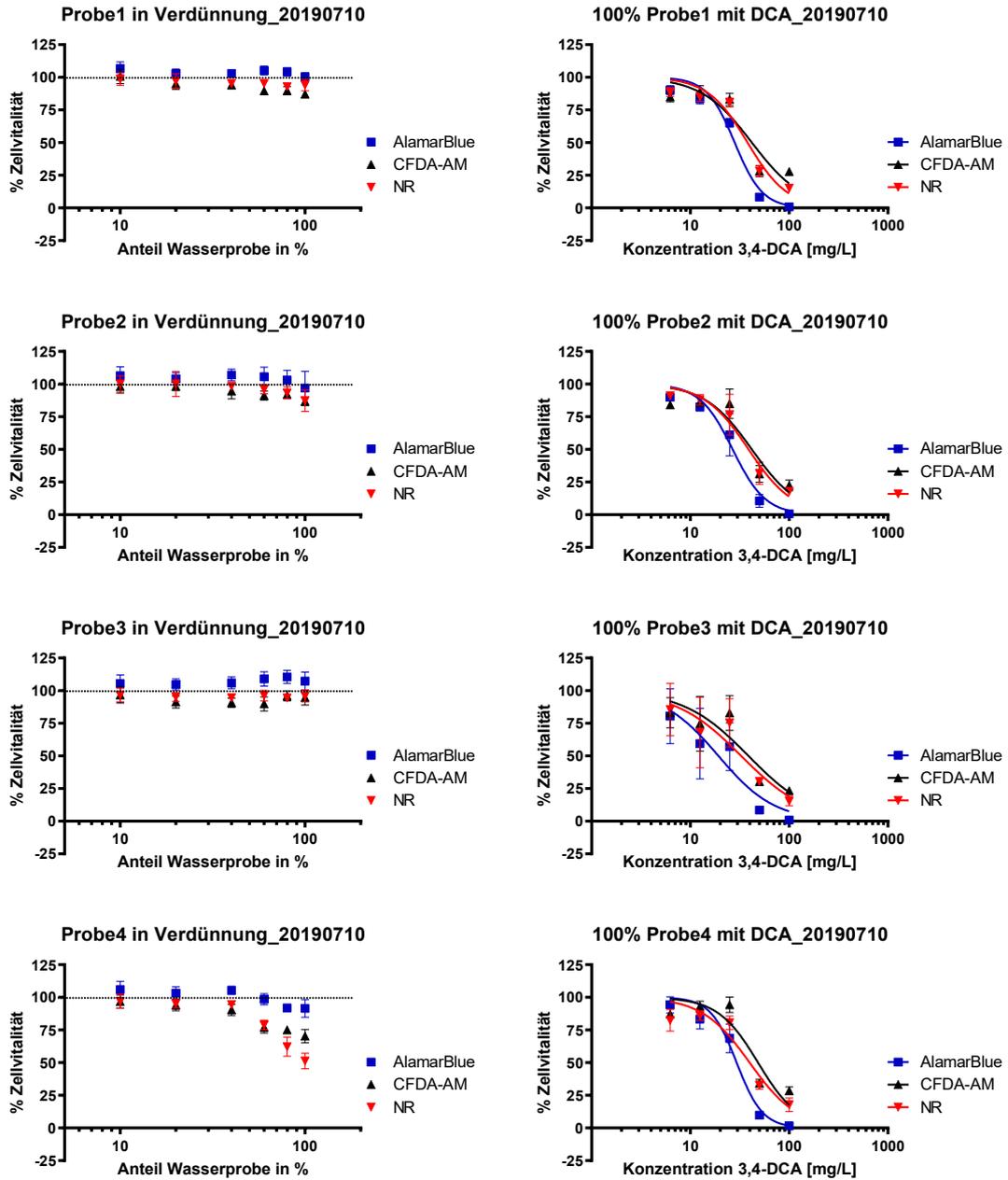


Abbildung 6. Übersicht über die Resultate der Proben mit Erhalt 09.07.2019. Linke Spalte: eigentliche Wasserproben in Verdünnungsstufen; Rechte Spalte: 3,4-DCA Positivkontrolle der Wasserproben. Probe 4 zeigt deutlichen Effekt für CFDA-AM (Membran- Integrität) und NR (Integrität der Lysosomen-Membranen) ab 60% Wasserprobe (unten links) aber nicht für AlamarBlue (metabolische Aktivität). Ein weiterer Einfluss auf die Matrix ist nicht zu erkennen (unten rechts).



#### 4.4.6 Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität W 36/37

Tabelle 6. Auswertung RTgill-WI-Zellinientest der Wasserproben mit Erhalt 17.09.2019

Probe ID	Resultat	Kommentar
1. Trockenloo	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
2. ARA Regensdorf	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
3. ARA Buchs	Nicht akut toxisch	Zellvitalität $\geq$ 90%; kein Einfluss der Matrix
4. Würenlos	Grenzfall / leicht akut toxisch	NR (Integrität der Lysosomen-Membranen) unter 90% bei 100% Probe in höchster Konzentration. Kein Effekt für AlamarBlue (metabolische Aktivität) und CFDA-AM (Membran-Integrität), leicht verstärkender Matrixeffekt



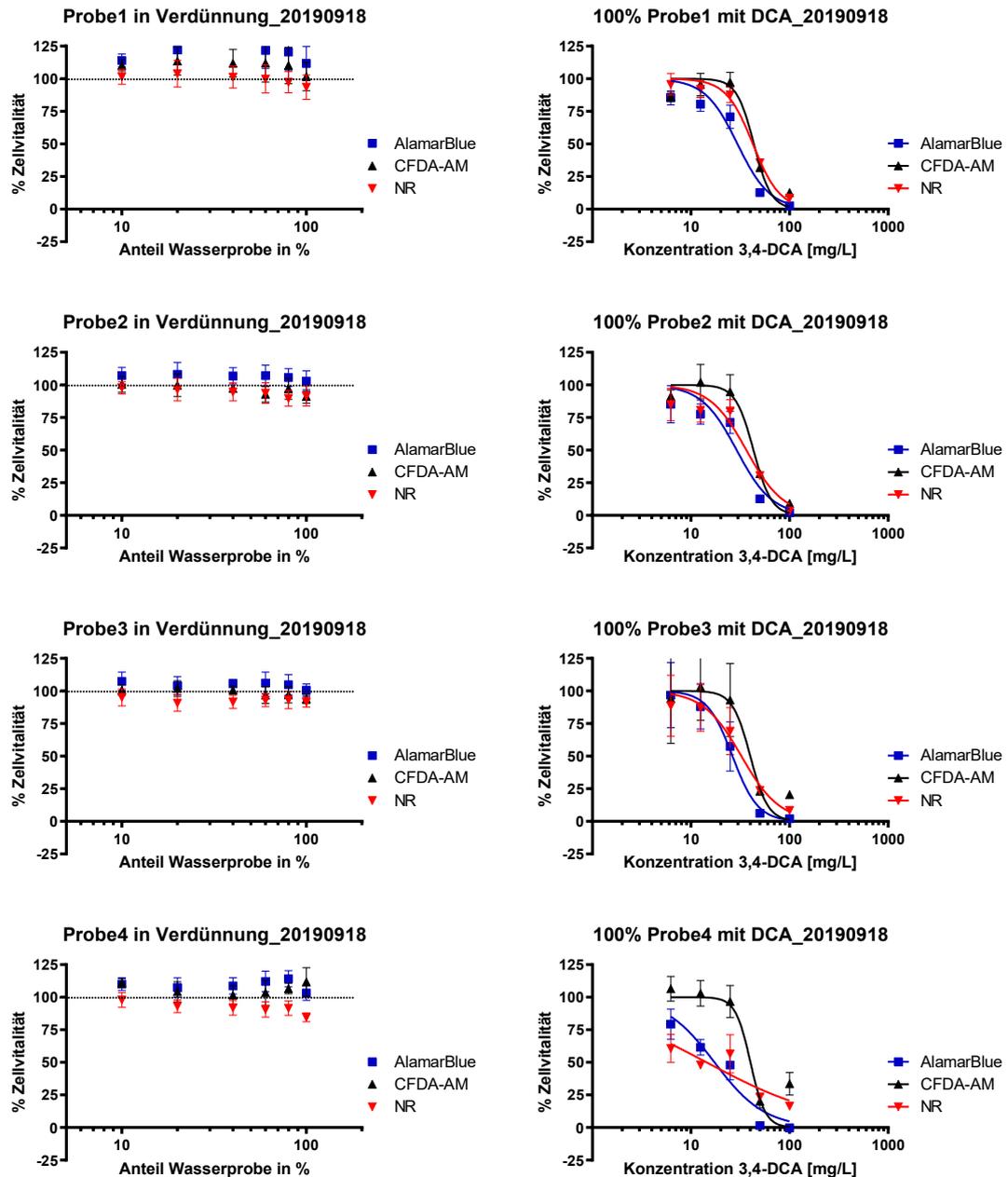


Abbildung 7. Übersicht über die Resultate der Proben mit Erhalt 17.09.2019. Linke Spalte: eigentliche Wasserproben in Verdünnungsstufen; Rechte Spalte: 3,4-DCA Positivkontrolle der Wasserproben. Probe 4 zeigt in höchster Konzentration einen leichten Einfluss auf NR (Integrität der Lysosomen-Membranen) (unten links) – in der dazugehörigen 3,4-DCA versetzten Wasserprobe (unten rechts) liegt der aus der Konzentrations-Wirkungskurve für AlamarBlue (metabolische Aktivität) und NR resultierende EC50-Wert (Konzentration bei der die Zellvitalität bei 50% liegt) leicht unterhalb vom Validitätsbereich, was eine leichte Verstärkung der Wirkung von 3,4-DCA durch die Matrix anzeigt.



## 5 SUBLETALE-EFFEKTE / GENEXPRESSIONSANALYSE

### 5.1 Hintergrund

Durch die Exposition der RTgill-W1 Zellen werden nicht nur Informationen über akut toxische Effekte gewonnen, auch die Erfassung von subletalen Effekten durch die Analyse der Expression von Biomarkergenen ist möglich. Dadurch kann man mehr über frühe Reaktionen im Fisch auf mögliche Umweltverunreinigungen in den Wasserproben in Erfahrung bringen und somit eine genauere Einschätzung über die Wasserqualität erhalten. Spezifische Biomarkergene liefern Informationen über z.B. Metall- und oxidativen Stress, Immunregulation und Abwehr von Krankheitserregern, Biotransformation und vieles mehr.

### 5.2 Testkontrollen und Auswertung

Alle untersuchten Biomarkergene wurden im Vergleich zu einer Wasserkontrollexposition ausgewertet. Bei der Wasserkontrolle wurden die Zellen mit 24h Aktivkohle behandelten Leitungswasser (Quelle Eawag, Dübendorf) exponiert. Als relevanter sublethaler Effekt ist eine 1-1.5-fache Regulation (abhängig vom untersuchten Marker) der Genexpression, im Vergleich zur Kontrolle, als Grenzwert festgelegt.



## 5.3 Biotransformation

Im Folgenden sind die für die Untersuchung von Biotransformation selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.3.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.3.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.3.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.3.1 Zusammenfassung Ergebnisse Biotransformation

Für die Untersuchung von subletalen Effekten, hervorgerufen durch organische Verbindungen, wurde die Regulation von sechs Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil der zellulären Detoxifizierung (Phase I und Phase II) von organischen Schadstoffverbindungen (genaue Funktion siehe Paragraph 5.3.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 8, detaillierte Darstellung 5.3.3) deuten auf eine generell verstärkte Belastung mit organischen Schadstoffverbindungen am Standort Würenlos hin, gefolgt von Buchs, Regensdorf und Trockenloo. Die einmalig getesteten Seitenbäche wiesen in der Betrachtung aller gemessenen Markergene keine erhöhte Expression auf.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännergaben	Oberwiesenbach	Harberenbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 8. Übersichtgraphik der Biotransformationsergebnisse: Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen sechs gemessenen Markergenen zur Untersuchung von zellulären Biotransformationseffekten.



### 5.3.2 Markergene

Tabelle 7. Biomarkergene für die Untersuchung von Biotransformationseffekten

Biomarkergene	Funktion
CYP1A (Cytochrom P450 1A)	Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist in die Metabolisierung verschiedenster Chemikalien involviert, einschliesslich Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs), alkylierte-PAKs, Polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Dioxinen.
CYP3A (Cytochrom P450 3A)	Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist in die Metabolisierung vorrangig aliphatischer Kohlenwasserstoffe oder Xenohormone involviert. Zudem metabolisiert es circa die Hälfte aller Medikamentenwirkstoffe welche oxidative Biotransformation unterlaufen (siehe auch Cyp3a drug substrate data base <a href="https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT003824#drugs">https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT003824#drugs</a> )
CYP51 (Cytochrom P450 51)	Die Genexpression dieses Phase I-Enzyms der zellulären Detoxifizierung wird im Vorhandensein von Azolen (Fungizide) sensitiv reguliert, wie z.B. Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol oder Ketaminazol.
GST (Glutathion-S-Transferase)	Die Konjugationsaktivität von Glutathion-S-Transferase spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Detoxifizierung chemotherapeutischer Substanzen, sowie verschiedener Medikamentenwirkstoffe, Pestizide und Karzinogene.
UGT (UDP-glukuronosyl transferases)	Die UDP-Glukuronosyltransferase ist verantwortlich für die Bindung von Glukuronsäure an Xenobitika. Das resultierende Konjugat ist hydrophiler und kann dadurch von der Zelle einfacher ausgeschieden werden als das Substratmolekül. Typische Substrate sind z.B. verschiedene Medikamentenwirkstoffe (Paracetamol, Phenylbutazon oder Thyroxin) sowie diverse Steroide und Pestizide.
SULT (Sulfotransferase)	Sulfotransferase ist verantwortlich für die Bindung von Sulfogruppen an Xenobitika, welche dadurch ebenfalls einfacher von der Zelle ausgeschieden werden können.



### 5.3.3 Genexpressionsergebnisse Biotransformation

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt. Eine Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramme ist in den Einzelberichten zu finden.

A) Resultate Cyp1a Genexpression										
Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkana	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	Cyp1a									
W 20/21	Cyp1a									
W 22/23	Cyp1a									
W 24/25	Cyp1a									
W 26/27	Cyp1a									
W 36/37	Cyp1a									
B) Resultate Cyp3a Genexpression										
Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkana	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	Cyp3a									
W 20/21	Cyp3a									
W 22/23	Cyp3a									
W 24/25	Cyp3a									
W 26/27	Cyp3a									
W 36/37	Cyp3a									
C) Resultate Cyp51 Genexpression										
Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkana	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	Cyp51									
W 20/21	Cyp51									
W 22/23	Cyp51									
W 24/25	Cyp51									
W 26/27	Cyp51									
W 36/37	Cyp51									

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2.5	2.5 ↔ 10	> 10
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 9.1. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von den Biomarkergenen für zelluläre Biotransformation A) Cyp1a, B) Cyp3a und C) Cyp51.



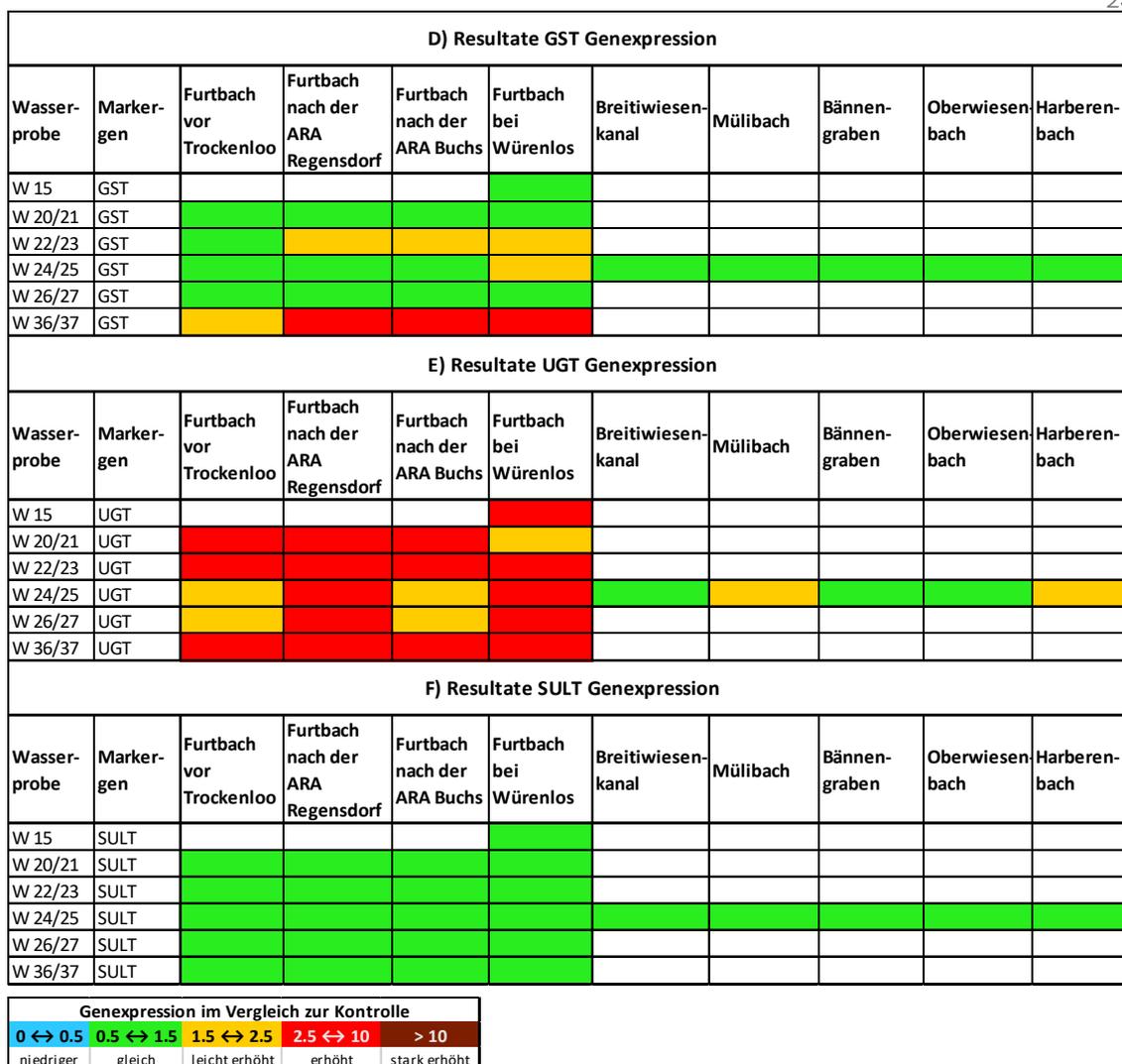


Abbildung 9.2. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von den Biomarkergenen für zelluläre Biotransformation D) GST, E) UGT und F) SULT.

### Vergleich Ergebnisse Markergene Biotransformation:

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, die höchsten Genexpressionswerte für die Gene Cyp1a und UGT gemessen. Dies deutet auf eine ganzjährige Belastung mit potentiellen Substraten (siehe Tabelle 7) dieser Enzyme hin. Mit Ausnahme des Markesgens SULT wurden generell die höchsten Expressionswerte am Standort Würenlos gemessen.

### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Die Standorte ARA Regensdorf, ARA Buchs und Würenlos zeigten zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Expression von mindestens einem von sechs Markergenen. Dies deutet auf eine generelle, nicht jahreszeitlich bedingte Exposition mit organischen Verbindungen, welche Substrate dieser Enzyme sind, hin. Der Standort Trockenloo zeigte nur in der W 26/27 keine erhöhte Expression von einem der Markergene, was auf eine geringere Belastung in dieser Woche hindeutet. Alle getesteten Seitenbäche von W 24/25 zeigten, bis auf Harberenbach, keine erhöhte Expression, was entsprechend auf eine geringere Belastung im Vergleich zu den anderen Standorten hinweist.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 8.



Tabelle 8. Auswertung Genexpression Biotransformation

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 9.1-2. Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	2. ARA Regensdorf	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	3. ARA Buchs	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	4. Würenlos	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit Cyp1a Substraten
	5. Würenlos Probe W15	Cyp1a, Cyp3a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, Cyp3a und UGT Substraten
W 22/23	1. Trockenloo	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	2. ARA Regensdorf	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	3. ARA Buchs	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	4. Würenlos	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
W 24/25	1. Trockenloo	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit Cyp1a Substraten
	2. ARA Regensdorf	Cyp1a, Cyp3a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, Cyp3a und UGT Substraten
	3. ARA Buchs		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	Cyp1a, Cyp3a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, Cyp3a und UGT Substraten
	5. Breitwiesenkanal		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	6. Mülibach		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	9. Harberenbach	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit Cyp1Substraten
W 26/27	1. Trockenloo		Keine über 1,5-fach erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	3. ARA Buchs	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit Cyp1a Substraten
	4. Würenlos	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
W 36/37	1. Trockenloo	Cyp1a und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a und UGT Substraten
	2. ARA Regensdorf	Cyp1a, GST und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, GST und UGT Substraten
	3. ARA Buchs	Cyp1a, GST und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, GST und UGT Substraten
	4. Würenlos	Cyp1a, GST und UGT	Erhöhte Belastung mit Cyp1a, GST und UGT Substraten



### 5.3.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind, desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für Biotransformation (Abb. 10) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle. Dies deutet auf ein unterschiedliches Belastungsprofil der einzelnen Standorte über die Zeit hin. Generell zeigt der Standort Würenlos für die meisten Zeitpunkte den grössten Abstand zur Wasserkontrolle auf, was auf eine stärkere Belastung mit organischen Verbindungen an diesem Standort hinweist. Des Weiteren scheint das Belastungsprofil der getesteten Seitenbäche (Abb. 10 C) sehr vergleichbar und geringer im Verhältnis zu den anderen Standorten zu sein, da diese ein sehr enges Cluster, welches nah an der internen Wasserkontrolle liegt, bilden.

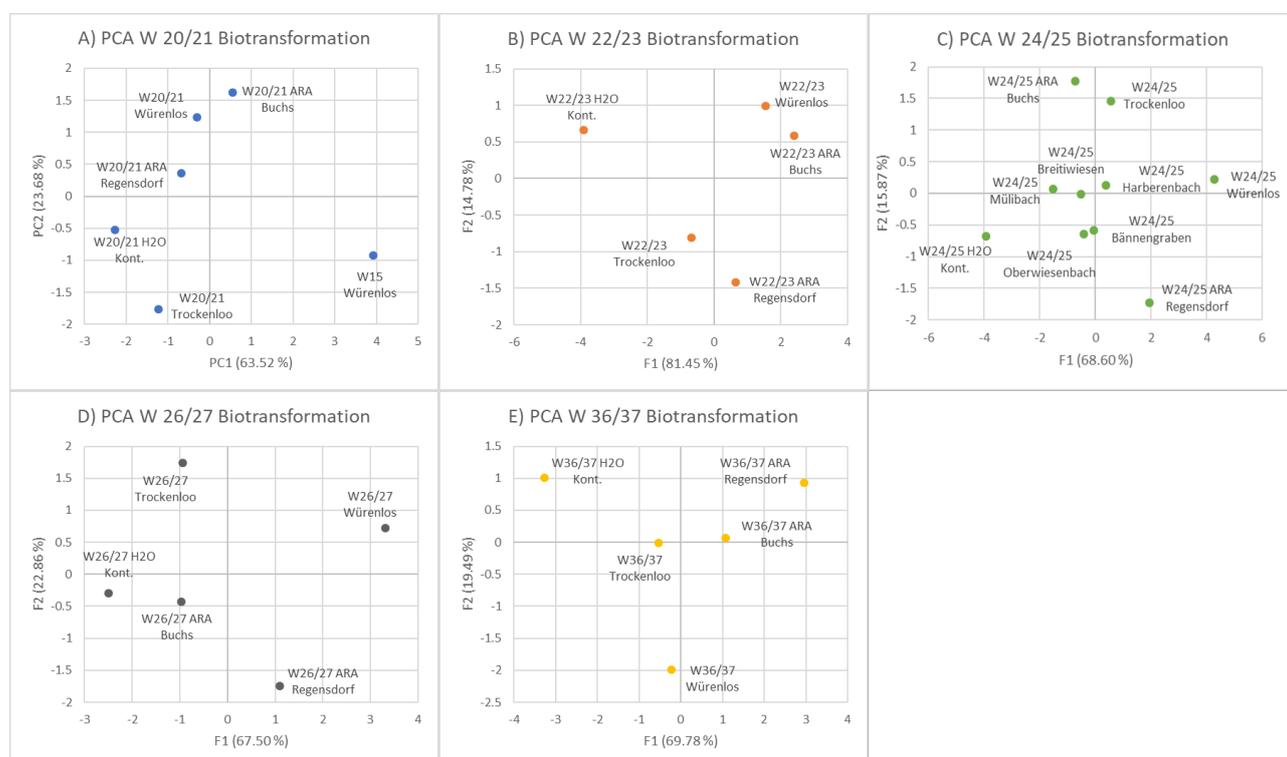


Abbildung 10. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für Biotransformation für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.4 Allgemeine Stressantwort

Im Folgenden sind die für die Untersuchung der allgemeinen Stressantwort selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.4.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.4.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.4.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.4.1 Zusammenfassung Ergebnisse allgemeine Stressantwort

Für die Untersuchung von subletalen Effekten, hervorgerufen durch allgemeinem Umweltstress (z.B. Hitzestress, Belastung mit natürlichen Umwelttoxinen usw.), wurde die Regulation von vier Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil zur Gewährleistung der Zellvitalität (genaue Funktion siehe Paragraph 5.4.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 11, detaillierte Darstellung 5.4.3) deuten auf eine generell verstärkte allgemeine Stressbelastung am Standort Würenlos hin, gefolgt von Buchs = Regensdorf und Trockenloo. Von den einmalig getesteten Seitenbächen wies nur die Probe W 24/27 Oberwiesenbach eine erhöhte Expression in der Summe aller Markergene auf.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwieskanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesenbach	Harberenbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 11. Übersichtsgraphik der Allgemeinen Stressantwort: Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen vier gemessenen Markergenen zur Untersuchung der allgemeinen zellulären Stressantwort.



## 5.4.2 Markergene

Tabelle 9. Biomarkergene für die Untersuchung der allgemeinen Stressantwort

Biomarkergene	Funktion
ABCB1 (ABC-Transporter B1, P-glycoprotein, MDRI)	Dieser Vertreter der ABC-Efflux-Transporter-Familie ist verantwortlich für den zellulären Efflux nicht-metabolisierter Substanzen. Das funktionelle Protein transportiert ein breites Spektrum unterschiedlichster Substrate einschliesslich amphiphiler Medikamentenwirkstoffe, hydrophober Kationen, Anthrazykline, Anthracene, Vincaalkaloide, Antibiotika, antivirale Wirkstoffe und natürliche Toxine (z.B. Microzystine) und verhindert dadurch eine Anreicherung dieser Substanzen in der Zelle.
ABCC1 (ABC-Transporter)	Dieser Vertreter der ABC-Efflux-Transportprotein-Familie ist für den zellulären Efflux metabolisierter Substanzen aus Phase II der zellulären Detoxifizierung verantwortlich.
PXR (Pregnan-X- Rezeptor)	Dieser nukleare Rezeptor fungiert als Sensor für toxische Nebenprodukte des endogenen Metabolismus sowie exogener Chemikalien und verbessert deren Eliminierung aus der Zelle durch die Regulierung verschiedener Detoxifizierungsgene. PXR wird durch eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen aktiviert, wie z.B. Steroide, Antibiotika, verschiedenste pflanzliche und andere Substanzen.
HSP70 (Heat shock pro- tein)	Bewahrung der Proteinintegrität durch die Verhinderung von Aggregation und Fehlfaltungen.



### 5.4.3 Genexpressionsergebnisse allgemeine Stressantwort

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt. Eine Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramme ist in den Einzelberichten zu finden.

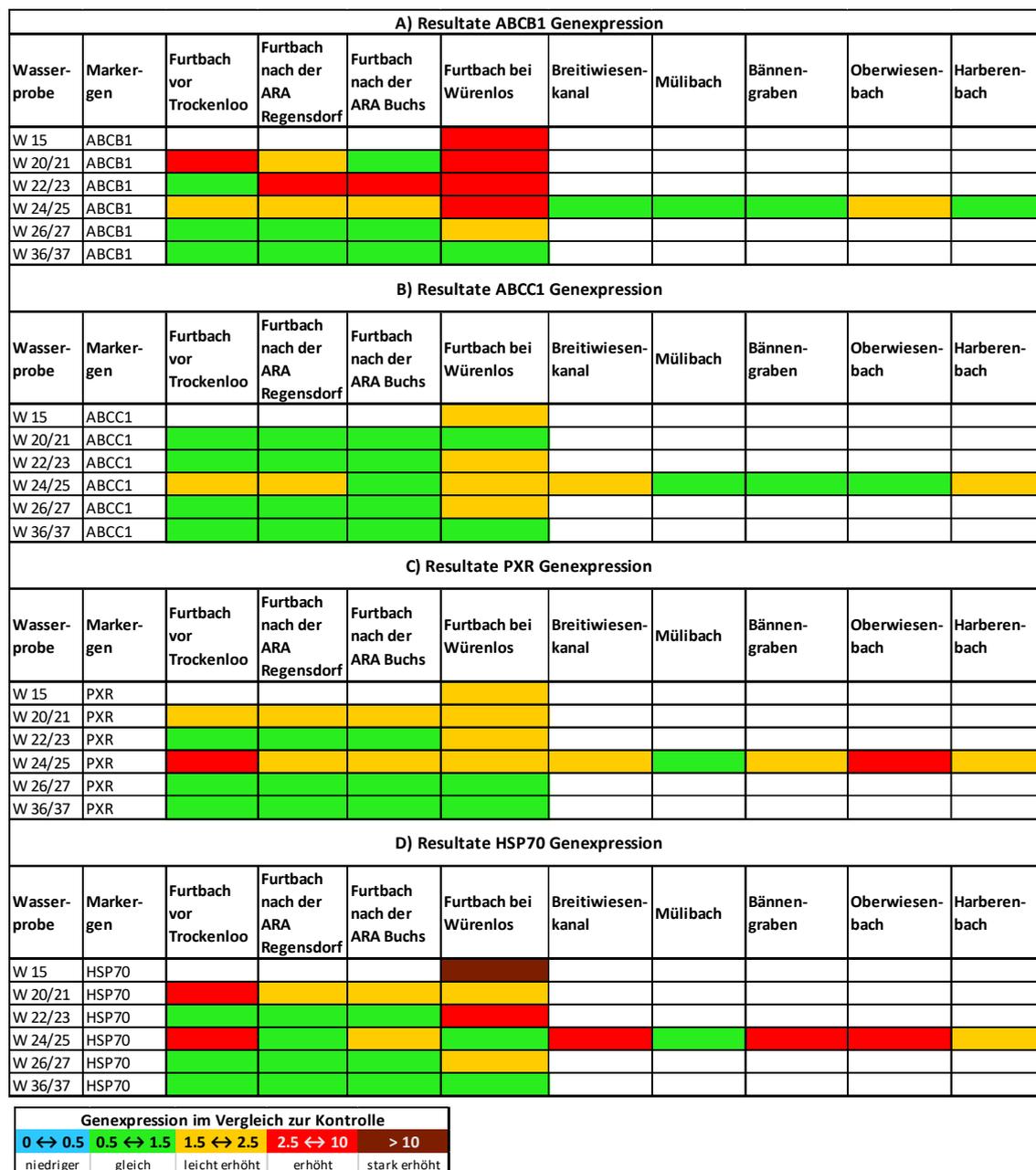


Abbildung 12. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomakergenen für allgemeine Stressantwort; A) ABCB1, B) ABCC1, C) PXR und D) HSP70.



**Vergleich Ergebnisse Markergene allgemeiner Stress:**

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, die höchsten Genexpressionswerte für die Gene HSP70 und ABCB1 gemessen, gefolgt von PXR und ABCC1 (Genfunktionen siehe Tabelle 9).

**Vergleich Standort und Zeitverlauf:**

Im zeitlichen Verlauf der Probenentnahme zeigten die Wochen W 15, W 20/21, W 22/23 und W 24/25 für die meisten Standorte erhöhte Expressionswerte im Vergleich zur internen Wasserkontrolle auf. Dies deutet auf generell schlechtere abiotische Umweltfaktoren bzw. höhere Xenobiotika-Belastung und einhergehende verstärkte Beeinträchtigung der Fischgesundheit hin. Von den getesteten Seitenbächen W 24/25 zeigten drei von fünf eine erhöhte Expression. In Woche W 26/27 war lediglich beim Standort Würenlos eine leicht erhöhte und in W 36/37 an keinem Standort eine abweichende Expression von der Kontrollsituation vorzufinden.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 10.



Tabelle 10. Auswertung Genexpression allgemeine Stressantwort

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 12 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo	ABCBI und HSP70	Erhöhte Belastung mit ABCBI Substraten. Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70), welche zu Zellschädigungen führen kann.
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	ABCBI	Erhöhte Belastung mit ABCBI Substraten
	5. Würenlos Probe W15	ABCBI, und HSP70	Erhöhte Belastung mit ABCBI, Substraten. Stark erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70), welche bereits nach 24h zu Zellschädigungen führt (siehe RTgill-WI-Test).
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	ABCBI	Erhöhte Belastung mit ABCBI Substraten
	3. ARA Buchs	ABCBI	Erhöhte Belastung mit ABCBI Substraten
	4. Würenlos	ABCBI, und HSP70	Stark erhöhte Belastung mit ABCBI, Substraten. Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70), welche bei längerer Belastung bereits nach 24h zu Zellschädigungen führt (siehe RTgill-WI-Test).
W 24/25	1. Trockenloo	PXR und HSP70	Erhöhte Belastung mit PXR Substraten, Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70)
	2. ARA Regensdorf		Keine über 1.5-fach erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine über 1.5-fach erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	ABCBI	Leicht erhöhte Belastung mit ABCBI Substraten
	5. Breitwiesenkanal	HSP70	Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70)
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben	HSP70	Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70)
	8. Oberwiesenbach	PXR und HSP70	Erhöhte Belastung mit PXR Substraten, Erhöhte Beeinträchtigung der Proteinintegrität (HSP70)
	9. Harberenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.4.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind, desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für allgemeine Stressantwort (Abb. 13) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle. Dies deutet auf ein unterschiedliches Belastungsprofil bzw. unterschiedliche allgemeinen Stresssituation der einzelnen Standorte über die Zeit hin. Generell zeigt der Standort Würtenlos für die meisten Zeitpunkte den grössten Abstand zur Wasserkontrolle auf, was auf eine starke Belastung an diesem Standort hinweist. Der Standort Buchs weist für W 20/21, W 22/23 und W 24/25 (ohne Betrachtung der Seitenbäche) den geringsten Abstand zur Wasserkontrolle auf, was auf eine geringere Belastung an diesen Zeitpunkten hinweist.

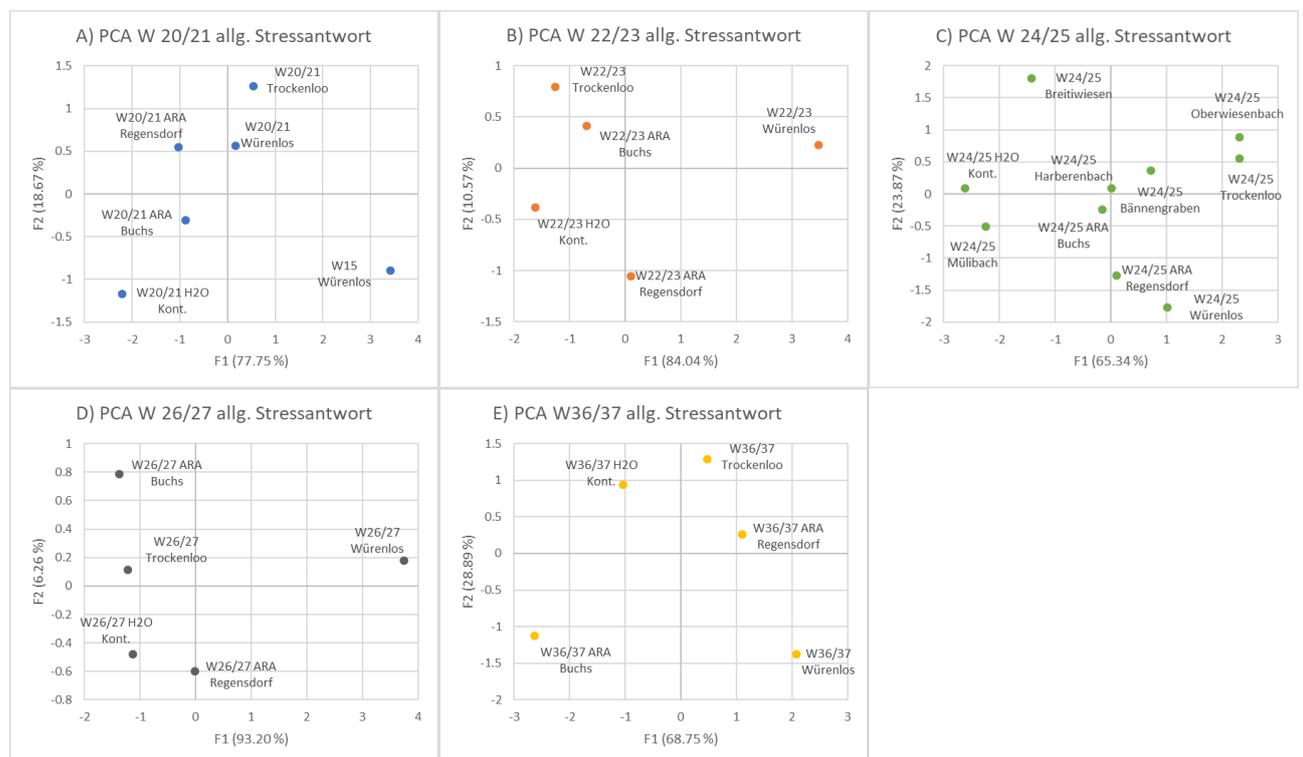


Abbildung 13. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für allgemeine Stressantwort für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.5 Zelluläre Immunantwort

Im Folgenden sind die für die Untersuchung der zellulären Immunantwort selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.5.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.5.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.5.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.5.1 Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Immunantwort

Für die Untersuchung von subletalen Effekten auf das Immunsystem, wurde die Regulation von fünf Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil für die Immunregulation von Fischen (genaue Funktion siehe Paragraph 5.5.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 14, detaillierte Darstellung 5.5.3) deuten auf eine generell verstärkte Belastung des Fischimmunsystems am Standort Würenlos hin, gefolgt von Regensdorf und Buchs = Trockenloo. Von den einmalig getesteten Seitenbächen wies nur die Probe W 24/27 Oberwiesenbach eine erhöhte Expression in der Summe aller Markergene auf.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännengraben	Oberwiesenbach	Harberenbach				
W 15													
W 20/21													
W 22/23													
W 24/25													
W 26/27													
W 36/37													
Summe Genexpression													
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 25%;">Kontrollbereich</td> <td style="width: 25%;">leicht erhöht</td> <td style="width: 25%;">erhöht</td> <td style="width: 25%;">stark erhöht</td> </tr> </table>										Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht										

Abbildung 14. Übersichtgraphik der zellulären Immunantwort: Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen fünf gemessenen Markergenen zur Untersuchung der zellulären Immunantwort im Fisch.



## 5.5.2 Markergene

Tabelle 11. Biomarkergene für die Untersuchung der zellulären Immunantwort

Biomarkergene	Funktion
IL-1b (Interleukin-1 beta)	Das Zytokin Interleukin-1b ist Entzündungsmediator und zentraler Botenstoff in der zellulären Antwort auf eine Reihe von Fremdeinflüssen, wie z.B. Lipopolysaccharide welche in der Membran von Gram-negativen Bakterien enthalten sind.
NFkB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)	NF-kB ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor und Entzündungsmediator, welcher über die Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription abhängiger Gene beeinflusst.
MYD88 (Myeloid differentiation primary response 88)	MyD88 ist ein Adapterprotein welches in der Immunabwehr der Zelle involviert ist. Beim Vorhandensein von Krankheitserregern wie Bakterien oder Viren, bindet MyD88 an Toll-like-Rezeptoren (Strukturen des sogenannten angeborenen Abwehrsystems) und löst dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche die Abwehrsysteme der Zelle aktiviert.
IFNa (Interferon IFN-α)	Interferon IFN-α gehört ebenfalls zu den Zytokinen und fungiert als immunstimulierender Entzündungsmediator der die Zelle anweist antivirale und antitumorale Proteine zu bilden und somit widerstandsfähiger macht.
TNF alpha (tumor necrosis factor alpha)	Der Tumornekrosefaktor-alpha reguliert Zytokine und andere Immunzellen, sowie den apoptotischen Zelltod (programmierter Zelltod) und inhibiert die Tumorgenese.

## 5.5.3 Genexpressionsergebnisse zelluläre Immunantwort

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsglyphiken – «Heatmaps» dargestellt. Eine Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramme ist in den Einzelberichten zu finden.



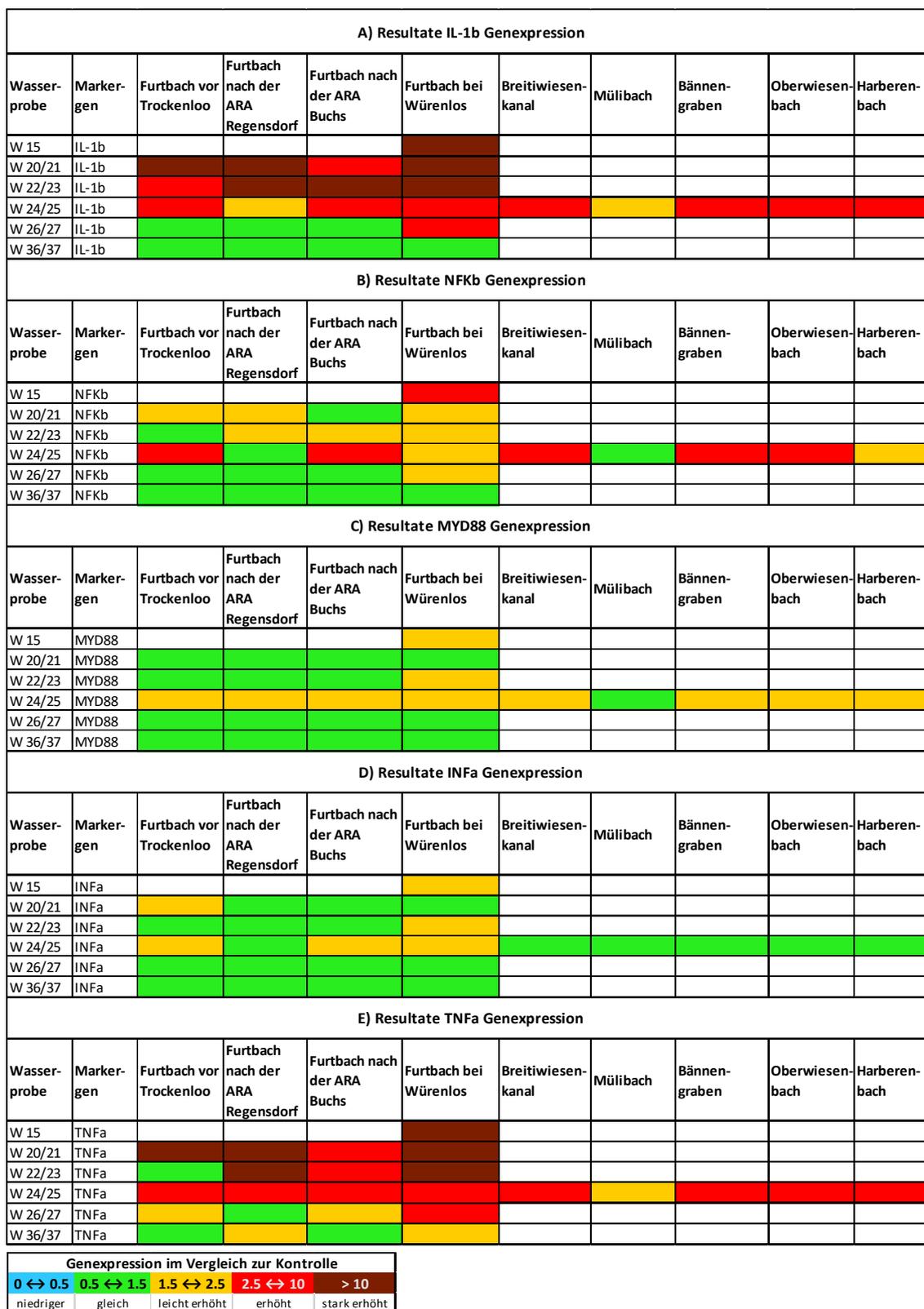


Abbildung 15. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für zelluläre Immunantwort: A) IL-1b, B) NFKb, C) MYD88, D) INFa und E) TNFa.



**Vergleich Ergebnisse Markergene zelluläre Immunantwort:**

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, die höchsten Genexpressionswerte für die Gene IL-1b und TNFa, gefolgt von NFKb, MYD88 und INFa (Genfunktionen siehe Tabelle 11) gemessen.

**Vergleich Standort und Zeitverlauf:**

Im zeitlichen Verlauf der Probenentnahme zeigen die Wochen W 15, W 20/21, W 22/23 und W 24/25 für alle Standorte erhöhte Expressionswerte im Vergleich zu den Wochen W 26/27 und W36/37 auf, mit Ausnahme von Würenlos W 26/27. Dies deutet auf eine potentiell höhere Beeinträchtigung der Fischgesundheit bedingt durch verstärkte Chemikalien-, Pathogenbelastung oder andere immunsystembeeinträchtigende Bedingungen hin. Bei längerer Belastung ist ein Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen möglich. Von den getesteten Seitenbächen W 24/25 zeigten mit Ausnahme vom Standort Mülibach alle anderen Standorte eine erhöhte Expression von mindestens zwei Markergenen.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 12.



Tabelle 12. Auswertung Genexpression zelluläre Immunantwort

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 15 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	2. ARA Regensdorf	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	3. ARA Buchs	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	4. Würenlos	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	5. Würenlos Probe W15	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Stark erhöhte Immunreaktion. Exposition verursacht das Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
W 22/23	1. Trockenloo	IL1-b	Erhöhte Immunreaktion.
	2. ARA Regensdorf	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	3. ARA Buchs	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	4. Würenlos	IL1-b, Nf-kB, TNFa und INF- $\alpha$	Stark erhöhte Immunreaktion. Exposition verursacht das Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
W 24/25	1. Trockenloo	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	2. ARA Regensdorf	Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	3. ARA Buchs	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	4. Würenlos	Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	5. Breitiwieskanal	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	8. Oberwiesenbach	IL1-b, Nf-kB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
	9. Harberenbach	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	IL1-b und TNFa	Erhöhte Immunreaktion
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.5.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für die zelluläre Immunantwort (Abb. 16) zeigten für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle. Für die meisten Zeitpunkte zeigt der Standort Würenlos den grössten Abstand zur Wasserkontrolle auf, was auf eine starke Belastung an diesem Standort hinweist, welche das Immunsystem von Fischen beeinträchtigen könnte.

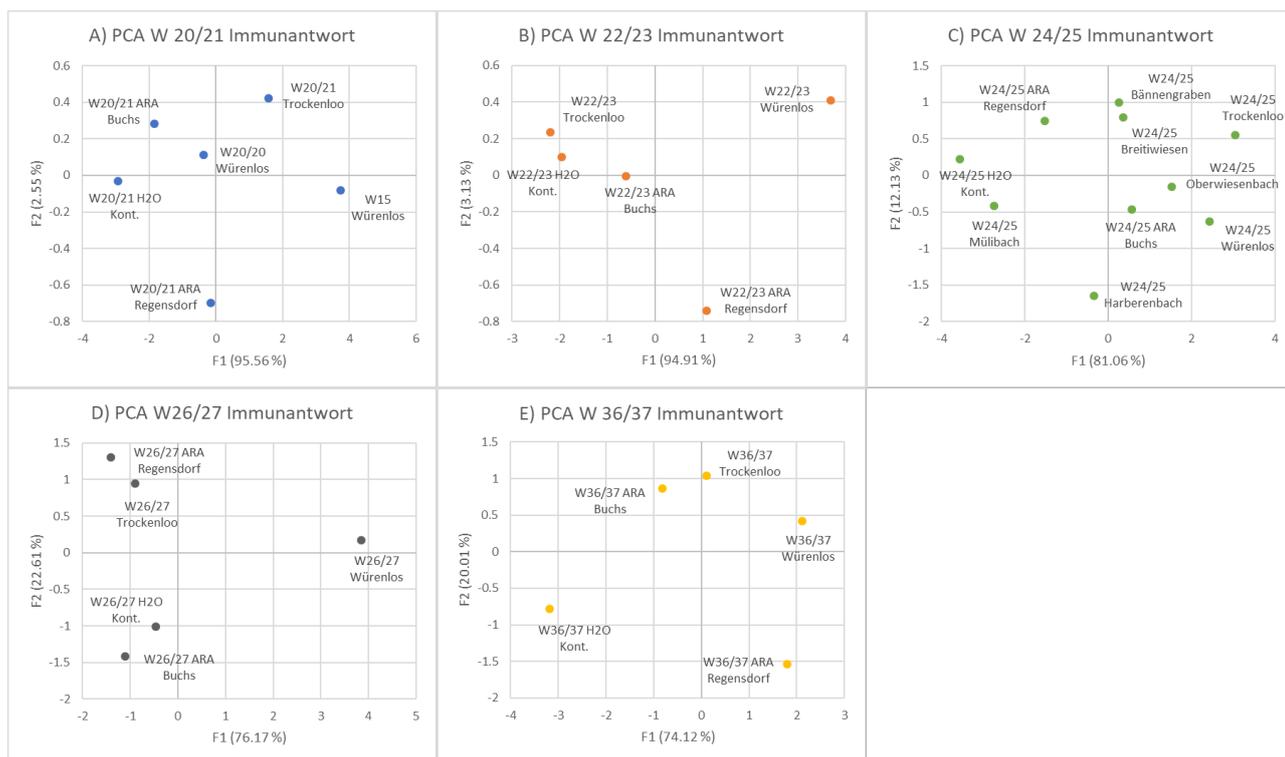


Abbildung 16. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für zelluläre Immunantwort für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.6 Zelluläre Metallbelastung

Im Folgenden sind die für die Untersuchung der zellulären Metallbelastung selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.6.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.6.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.6.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.6.1 Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Metallbelastung

Für die Untersuchung von subletalen Effekten hervorgerufen durch erhöhte Metallbelastung, wurde die Regulation von zwei Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil für die zelluläre Bindung und Detoxifizierung von Schwermetallen (genaue Funktion siehe Paragraph 5.6.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 17, detaillierte Darstellung 5.6.3) deuten auf eine generell verstärkte Metallbelastung am Standort Würenlos hin, gefolgt von Buchs, Regensdorf und Trockenloo. Von den einmalig getesteten Seitenbächen zeigten die Proben vom Breitwiesenbach, Mülibach und Bännengraben eine erhöhte Expression in der Summe aller Markergene auf.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännengraben	Oberwiesenbach	Harberenbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 17. Übersichtsdarstellung der zellulären Metallbelastung. Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen zwei gemessenen Markergenen zur Untersuchung der zellulären Metallbelastung im Fisch.



## 5.6.2 Markergene

Tabelle 13. Biomarkergene für die Untersuchung der zellulären Metallbelastung

Biomarkergene	Funktion
MTa (Metallothionein A)	<p>Metallothionein A ist für die Bindung von sowohl physiologischen (z.B. Zink, Kupfer, Selenium), als auch xenobiotischen (z.B. Kadmium, Quecksilber, Silber, Arsen) Schwermetallen verantwortlich. Die Bindung erfolgt über die Thiolgruppen an den Cysteinenden des Proteins.</p> <p>Zusätzlich wird MTa sensitiv gegenüber Glukokortikoid-Exposition reguliert, da dieses Protein ein «Glukokortikoide Responsive-Element» (GRE) im Promotor besitzt.</p>
MTb (Metallothionein b)	<p>Metallothionein A ist für die Bindung von sowohl physiologischen (z.B. Zink, Kupfer, Selenium), als auch xenobiotischen (z.B. Kadmium, Quecksilber, Silber, Arsen) Schwermetallen verantwortlich. Die Bindung erfolgt über die Thiolgruppen an den Cysteinenden des Proteins.</p>



### 5.6.3 Genexpressionsergebnisse Metallbelastung

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt. Eine Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramme ist in den Einzelberichten zu finden.

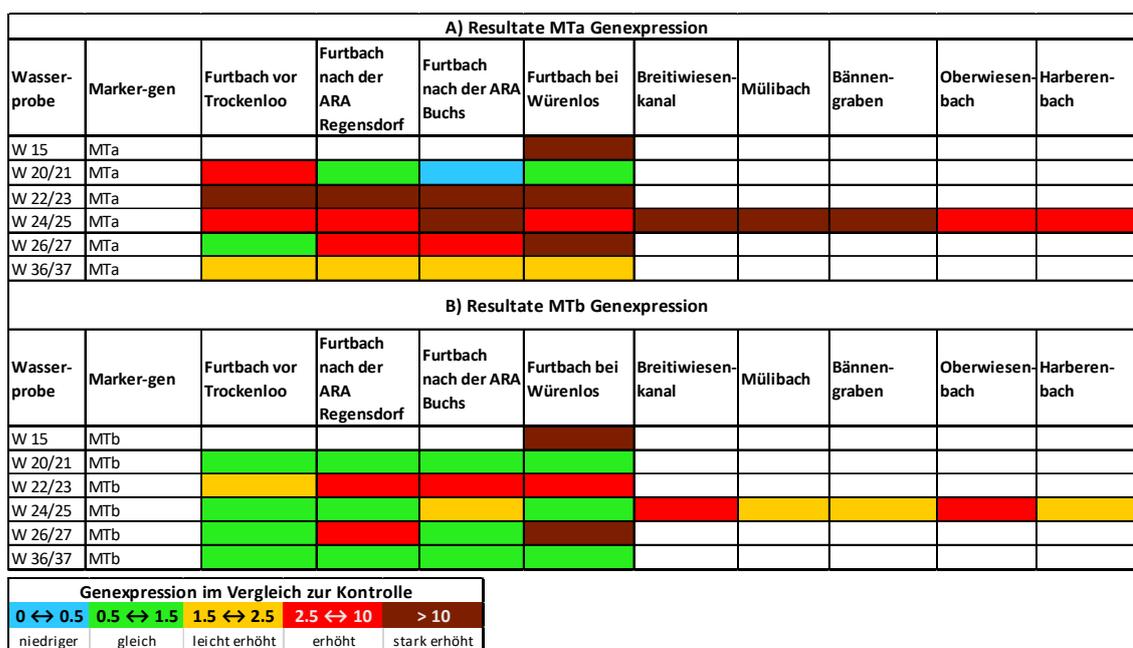


Abbildung 18. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für zelluläre Metallbelastung: A) MTa, B) MTb.

Bei diesen Markern ist zu beachten das man von einer potentiell erhöhten Metallbelastung ausgehen kann, wenn beide Marker gleichzeitig eine erhöhte Expression aufzeigen. Ist nur MTa reguliert, könnte dies auch ein Hinweis für eine mögliche Glukokortikoidexposition sein (siehe Tabelle 14.).

#### Vergleich Ergebnisse Markergene Metallbelastung:

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, die höchsten Genexpressionswerte für die Gene MTa gefolgt von MTb (Genfunktionen siehe Tabelle 13) gemessen.

#### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Im zeitlichen Verlauf der Probenentnahme zeigten die Wochen W 15, W 22/23, W 24/25 und W 26/27 für fast alle Standorte erhöhte Expressionswerte im Vergleich zu den Wochen W 20/21 (Ausnahme Trockenloo) und W36/37. Würenlos W 15, W 22/23 und W 26/27, Regensdorf W 22/23 und W 26/27, Buchs W 22/23, Breitiwiesenkanaal und Oberwiesenbach W 24/25 zeigten eine erhöhte Expression von beiden MT's. Dies deutet auf eine erhöhte Schwermetallbelastung hin.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 14.



Tabelle 14. Auswertung Genexpression Metallbelastung

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 18 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe W15	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
W 22/23	1. Trockenloo	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Schwache Regulierung Glukokortikoidmarker!
	2. ARA Regensdorf	MTa	Eventuell keine Schwermetallbelastung? Regulierung Glukokortikoidmarker!
	3. ARA Buchs	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
	4. Würenlos	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
W 24/25	1. Trockenloo	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
	2. ARA Regensdorf	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Schwache Regulierung Glukokortikoidmarker!
	3. ARA Buchs	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Schwache Regulierung Glukokortikoidmarker!
	4. Würenlos	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
	5. Breitwieskanal	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
	6. Mülibach	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Schwache Regulierung Glukokortikoidmarker!
	7. Bännengraben	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
	8. Oberwiesenbach	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
	9. Harberenbach	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
	3. ARA Buchs	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker!
	4. Würenlos	MTa und MTb	Erhöhte Schwermetallbelastung
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.6.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für zelluläre Metallbelastung (Abb. 19) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Was-serkontrolle.

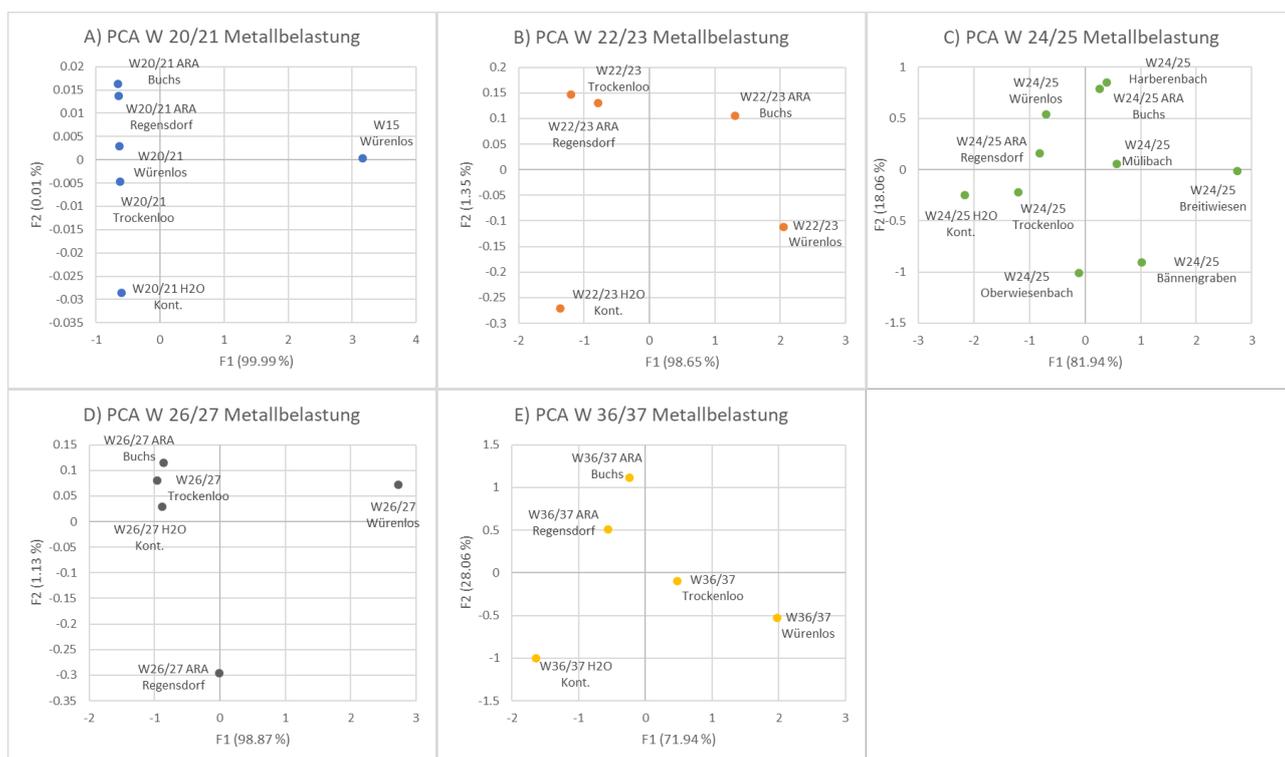


Abbildung 19. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für Metallbelastung für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.7 Glukokortikoidbelastung

Im Folgenden sind die für die Untersuchung der Glukokortikoidbelastung selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.7.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.7.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.7.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.7.1 Zusammenfassung Ergebnisse Glukokortikoidbelastung

Für die Untersuchung von subletalen Effekten hervorgerufen durch erhöhte Glukokortikoidbelastung, wurde die Regulation von zwei Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil für die zelluläre Metabolisierung von Glukokortikoiden (genaue Funktion siehe Paragraph 5.7.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 20, detaillierte Darstellung 5.7.3) deuten auf eine generell geringe Glukokortikoidbelastung von allen Wasserproben hin. Einzig die Probe W 22/23 Würenlos rief eine erhöhte Expression in der Summe aller Markergene hervor, was auf eine erhöhte Belastung hinweist.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenloos	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenskanal	Mülibach	Bännergaben	Oberwiesensbach	Harberensbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 20. Übersichtsdarstellung der zellulären Glukokortikoidbelastung. Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen zwei gemessenen Markergenen zur Untersuchung der zellulären Glukokortikoidbelastung im Fisch.



## 5.7.2 Markergene

Tabelle 15. Biomarkergene für die Untersuchung von Glukokortikoidbelastung

Biomarkergene	Funktion
GR2 (Glukokortikoidrezeptor 2)	GR, ist ein intrazellulärer Hormonrezeptor, der Glukokortikoide wie Dexamethason Cortisol/Hydrocortison, Prednisolon und andere bindet. Nach der Bindung folgt die Regulierung nachgeschalteter Gene.
FKBP5 (FK506 binding protein 5)	FKBP5 spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation und grundlegenden zellulären Prozessen wie z.B. Proteinfaltung. Die Expression wird sensitiv durch die Aktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors reguliert.

## 5.7.3 Genexpressionsergebnisse Glukokortikoidbelastung

A) Resultate GR2 Genexpression										
Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	GR2									
W 20/21	GR2									
W 22/23	GR2									
W 24/25	GR2									
W 26/27	GR2									
W 36/37	GR2									
B) Resultate FKBP5 Genexpression										
Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	FKBP5									
W 20/21	FKBP5									
W 22/23	FKBP5									
W 24/25	FKBP5									
W 26/27	FKBP5									
W 36/37	FKBP5									

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2.5	2.5 ↔ 10	> 10
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 21. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für Glukokortikoidbelastung: A) GR2 und B) FKBP5.



### Vergleich Ergebnisse Markergene Glukokortikoidbelastung:

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, die höchsten Genexpressionswerte für die Gene FKBP5 gefolgt von GR2 (Genfunktionen siehe Tabelle 15) gemessen.

### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Nur Würenlos W 22/23 zeigt eine erhöhte Expression von beiden Markergenen und Regensdorf W 22/23 und W 36/37 von FKBP5. Dies deutet auf eine möglich erhöhte Glukokortikoidbelastung hin.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 16.

Tabelle 16. Auswertung Genexpression Glukokortikoidbelastung

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 21 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe W15		Keine erhöhte Regulation messbar
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	FKBP5	Erhöhte Glukokortikoidbelastung
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	FKBP5, GR2	Erhöhte Glukokortikoidbelastung
W 24/25	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Breitwiesenkanal		Keine erhöhte Regulation messbar
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
	9. Harberenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	FKBP5	Erhöhte Glukokortikoidbelastung
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.7.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für Glukokortikoidbelastung (Abb. 22) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle. Bis auf W 24/26 und W 36/37 zeigt der Standort Würenlos für alle anderen Zeitpunkte den grössten Abstand zur Wasserkontrolle auf, was auf eine erhöhte Belastung mit Glukokortikoiden an diesem Standort hinweist. Die Seitenbäche mit Ausnahme des Mülibachs bilden ein enges Cluster, was auf sehr vergleichbare Belastungsbedingungen hinweist.

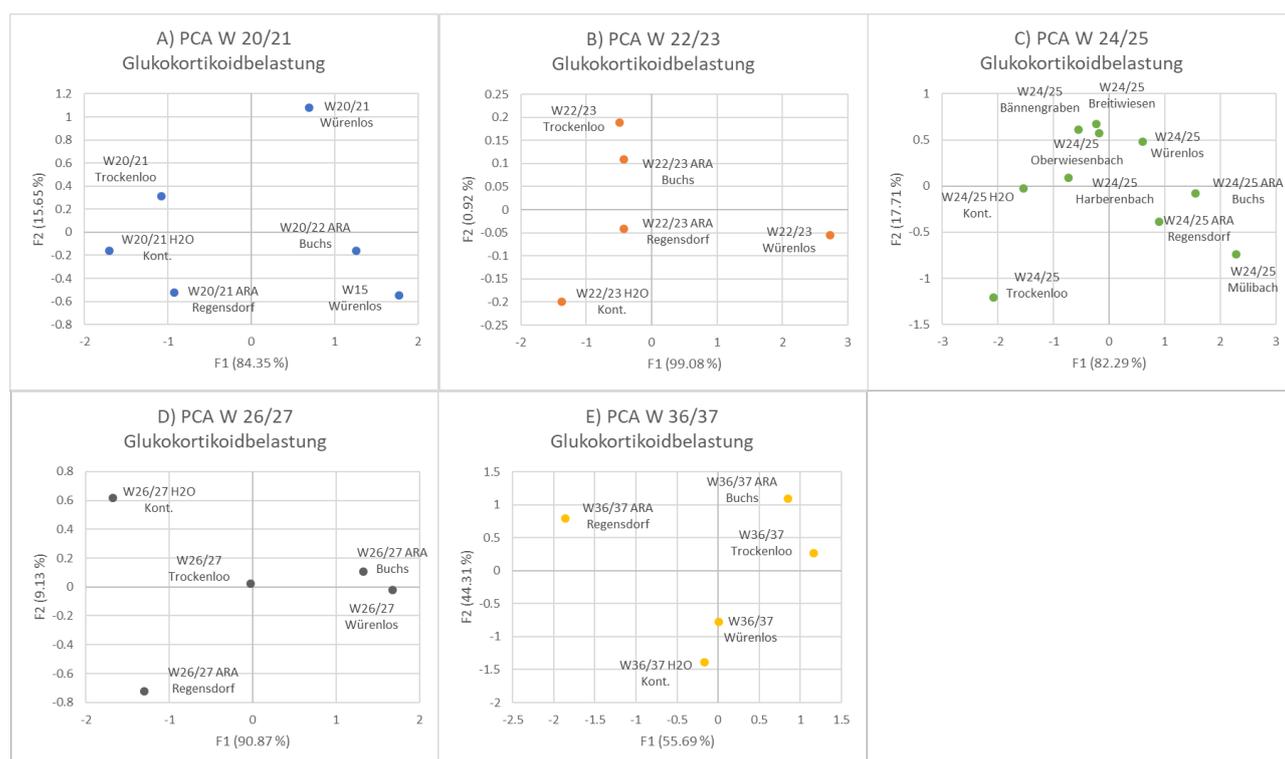


Abbildung 22. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für Glukokortikoidbelastung für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.8 Oxidativer Stress

Im Folgenden sind die für die Untersuchung von oxidativen Stress selektierten Markergene näher in ihrer Funktion beschrieben (siehe 5.8.2) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.8.3) und Principal Component Analyse (siehe 5.8.4) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.8.1 Zusammenfassung Ergebnisse oxidativer Stress

Für die Untersuchung von subletalen Effekten hervorgerufen durch oxidativen Stress, wurde die Regulation von zwei Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essentieller Bestandteil für zelluläre Abwehrreaktion gegenüber oxidativem Stress (genaue Funktion siehe Paragraph 5.8.2).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (Zusammenfassung Abb. 23, detaillierte Darstellung 5.8.3) deuten generell auf keinen erhöhten oxidativen Stress von allen Wasserproben hin. Eine leicht erhöhte Expression in der Summe aller Markergene wurde in sieben von neun getesteten Proben vom Zeitpunkt W 26/27 gemessen.

Wasserprobe	Furtbach vor Trockenlo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesenn-bach	Harberenbach
W 15									
W 20/21									
W 22/23									
W 24/25									
W 26/27									
W 36/37									

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 23. Übersichtsdarstellung oxidativer Stress. Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen zwei gemessenen Markergenen zur Untersuchung von oxidativem Stress im Fisch.



## 5.8.2 Markergene

Tabelle 17. Biomarkergene für die Untersuchung von oxidativen Stress

Biomarkergene	Funktion
Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2)	Erste zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress, welche die Regulierung verschiedener antioxidativer Signalwege und Schutzgene initiiert, die für die Versorgung der Zelle mit Antioxidantien zuständig sind.
CAT (Katalase)	Katalase detoxifiziert Wasserstoffperoxid indem es dessen Umsetzung zu Wasser und zweiwertigen Sauerstoff katalysiert.

## 5.8.3 Genexpressionsergebnisse oxidativer Stress

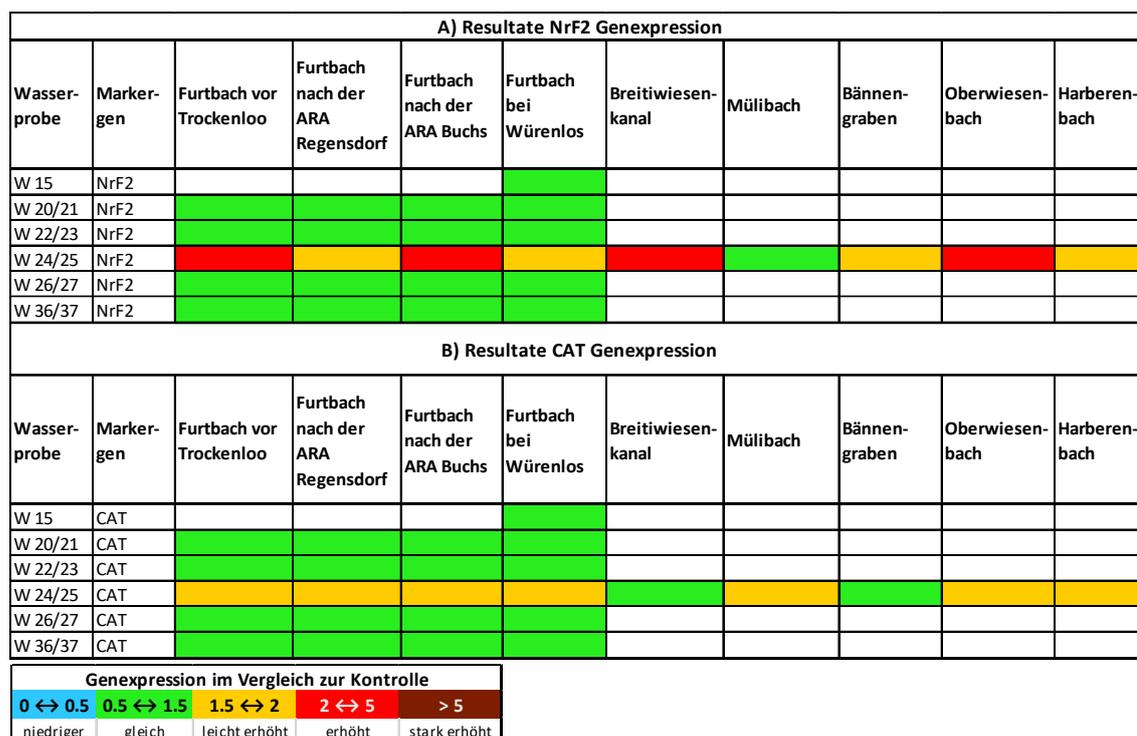


Abbildung 24. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für oxidativen Stress: A) Nrf2 und B) CAT.

### Vergleich Ergebnisse Markergene oxidativer Stress:

Generell wurden für alle untersuchten Wasserproben der ganzen Mess-Kampagne, erhöhte Genexpressionswerte für die Gene Nrf2 gefolgt von CAT nur in den Proben von W 24/25 (Genfunktionen siehe Tabelle 17) gemessen.



### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine erhöhte Expression von NrF2 wurde nur bei Trockenloo, Buchs, Breitiwiesenkanal und Oberwiesenkanal W 24/25 gemessen. Generell waren die Expressionswerte von allen Standorten in W 24/25 höher im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten. Dies könnte auf erhöhten oxidativen Stress zu diesem Zeitpunkt hinweisen. Für alle anderen Zeitpunkte konnte kein Effekt gemessen werden.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 18.

Tabelle 18. Auswertung Genexpression oxidativen Stress

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 24 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe WI5		Keine erhöhte Regulation messbar
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 24/25	1. Trockenloo	NFKB	Erhöhter oxidativer Stress
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs	NFKB	Erhöhter oxidativer Stress
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Breitiwiesenkanal	NFKB	Erhöhter oxidativer Stress
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach	NFKB	Erhöhter oxidativer Stress
	9. Harberenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.8.4 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für oxidativen Stress (Abb. 25) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle.

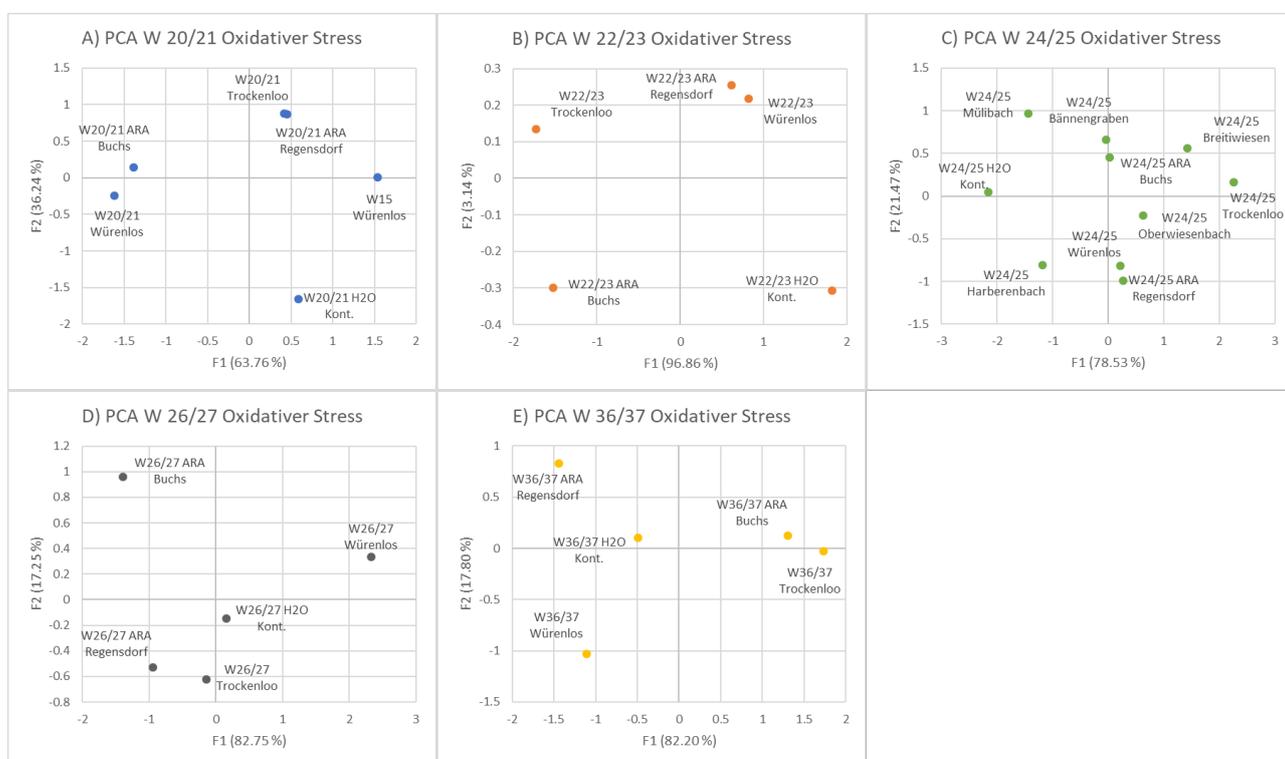


Abbildung 25. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für oxidativen Stress für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 5.9 Neurotoxizität

Im Folgenden ist für die Untersuchung der Neurotoxizität das ausgewählte Markergen ACHE näher in seiner Funktion beschrieben (siehe 5.9.1) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.9.1) und Principal Component Analyse (5.11.3) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.9.1 Markergene

Tabelle 19. Biomarkergene für die Untersuchung von Neurotoxizität

Biomarkergene	Funktion
ACHE (Acetylcholinesterase)	Die Acetylcholinesterase ist ein Enzym aus der Gruppe der Cholinesterasen, welches Neurotransmitter reguliert. Es wird durch organophosphorhaltige Substanzen wie Nervengifte oder Pestizide inhibiert.

### 5.9.2 Genexpressionsergebnisse Neurotoxizität

Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	ACHE									
W 20/21	ACHE									
W 22/23	ACHE									
W 24/25	ACHE									
W 26/27	ACHE									
W 36/37	ACHE									

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 26. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens ACHE zur Bestimmung von neurotoxischen Effekten.

#### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine erhöhte Expression von ACHE wurde nur bei Würenlos W 15 und W 24/25, Trockenloo W 24/25, Oberwiesenbach W 24/25 und Harberenbach W 24/25 gemessen. Dies deutet auf eine erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren hin (siehe Tabelle 19), welches bei längerer Belastung zum Auftreten von neurotoxischen Effekten führen kann.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 20.

Tabelle 20. Auswertung Genexpression Neurotoxizität

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 26)	Deutung
--------	----------	-------------------	---------



		Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	
W 20/21	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe WI5	ACHE	Erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von neurotoxischen Effekten.
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 24/25	1. Trockenloo	ACHE	Erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von neurotoxischen Effekten.
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	ACHE	Erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von neurotoxischen Effekten.
	5. Breitwieskanal		Keine erhöhte Regulation messbar
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach	ACHE	Erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von neurotoxischen Effekten.
	9. Harberenbach	ACHE	Erhöhte Exposition mit ACHE Inhibitoren Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von neurotoxischen Effekten.
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



## 5.10 Endokrine Wirkung

Im Folgenden ist für die Untersuchung von endokrinen Wirkungen das Markergen ERA näher in seiner Funktion beschrieben (siehe 5.10.1) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.10.2) und Principal Component Analyse (5.11.3) ausgewertet und grafisch dargestellt.

### 5.10.1 Markergene

Tabelle 21. Biomarkergene für die Untersuchung von endokriner Wirkung

Biomarkergene	Funktion
ERa (Estrogenrezeptor alpha)	Der Estrogenrezeptor ERa ist ein Steroidrezeptor der durch Steroidhormone wie Estrogen oder Xenoestrogen aktiviert wird.

### 5.10.2 Genexpressionsergebnisse endokrine Wirkung

Wasserprobe	Marker-gen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitiwiesen kanal	Mülibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	Era									
W 20/21	Era									
W 22/23	Era									
W 24/25	Era									
W 26/27	Era									
W 36/37	Era									

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 27. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens ERA für endokrine Wirkung.

#### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine erhöhte Expression von ERA wurde nur bei Würenlos W 22/23 und W 24/25 und Regensdorf W 22/23 gemessen. Dies deutet auf eine erhöhte Belastung mit östrogenaktiven Substanzen hin.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 22.



Tabelle 22. Auswertung Genexpression endokrine Wirkung

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 27 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe W15		Keine erhöhte Regulation messbar
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf	ERa	Erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen.
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	ERa	Erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen.
W 24/25	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	ERa	Erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen.
	5. Breitwiesenkanal		Keine erhöhte Regulation messbar
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
	9. Harberenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



## 5.11 Apoptose (programmierter Zelltod)

Im Folgenden ist für die Untersuchung von Apoptose-Effekten das Markergen p53 näher in seiner Funktion beschrieben (siehe 5.11.1) und die Ergebnisse der Genexpression von allen Probezeitpunkten in tabellarischer Form und mittels Heatmap (siehe 5.11.2) und Principal Component Analyse (siehe 5.11.3) ausgewertet und grafisch dargestellt

### 5.11.1 Markergene

Tabelle 23. Biomarkergene für die Untersuchung Apoptose

Biomarkergene	Funktion
p53 (Tumor suppressor p53)	Der Tumorsuppressor p53 spielt eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose (programmierter Zelltod) sowie der DNA-Reparatur.

### 5.11.2 Genexpressionsergebnisse Apoptose

Wasserprobe	Markergen	Furtbach vor Trockenloo	Furtbach nach der ARA Regensdorf	Furtbach nach der ARA Buchs	Furtbach bei Würenlos	Breitwiesenkanal	Müllibach	Bännen-graben	Oberwiesen-bach	Harberen-bach
W 15	p53									
W 20/21	p53									
W 22/23	p53									
W 24/25	p53									
W 26/27	p53									
W 36/37	p53									

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abbildung 28. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens p53 für Apoptose-Effekte.

#### Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine erhöhte Expression von p53 wurde nur bei Würenlos W 15, W 22/23 und W 24/25 gemessen. Dies deutet darauf hin das an diesem Standort vermindert gute Bedingungen für eine optimale Fischgesundheit vorliegen bzw. eine erhöhte Belastung genotoxisch wirkender Stoffe vorliegt.

Detaillierte Auswertung siehe Tabelle 23.



Tabelle 23. Auswertung Genexpression Apoptose

Proben	Standort	Erhöhte (Abb. 28 Rot markiert) Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
W 20/21	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
	5. Würenlos Probe W15	p53	Erhöhte Apoptose-Effekte messbar. Bei längerer Belastung Auftreten von subletalen und letalen Effekten.
W 22/23	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	p53	Erhöhte Apoptose-Effekte messbar. Bei längerer Belastung Auftreten von subletalen und letalen Effekten.
W 24/25	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos	p53	Erhöhte Apoptose-Effekte messbar. Bei längerer Belastung Auftreten von subletalen und letalen Effekten.
	5. Breitiwieskanal		Keine erhöhte Regulation messbar
	6. Mülibach		Keine erhöhte Regulation messbar
	7. Bännengraben		Keine erhöhte Regulation messbar
	8. Oberwiesenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
	9. Harberenbach		Keine erhöhte Regulation messbar
W 26/27	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar
W 36/37	1. Trockenloo		Keine erhöhte Regulation messbar
	2. ARA Regensdorf		Keine erhöhte Regulation messbar
	3. ARA Buchs		Keine erhöhte Regulation messbar
	4. Würenlos		Keine erhöhte Regulation messbar



### 5.11.3 Principal Component Analyse (PCA) Neurotoxizität, endokrine Wirkung und Apoptose

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Beprobungsstandorten und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Mittels PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker von den verschiedenen Standorten integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Dies bedeutet je weiter zwei Werte (=Standorte) voneinander entfernt sind desto unterschiedlicher sind sie z.B. hinsichtlich Schadstoffbelastung oder Fischgesundheit.

Für die Durchführung einer PCA Analyse für Genexpressionsdaten müssen mindestens zwei Gene miteinander verglichen werden. Da für Neurotoxizität, endokrine Wirkung und Apoptose jeweils nur ein Markergen untersucht wurde, werden diese Datensätze für eine PCA-Analyse zusammengefasst.

Die PCA-Analysen der Genexpression aller Biomarker für Neurotoxizität, endokrine Wirkung und Apoptose (Abb. 29) zeigt für alle Beprobungszeitpunkte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Beprobungsstandorte und unterschiedliche Abstände zur internen Wasserkontrolle.

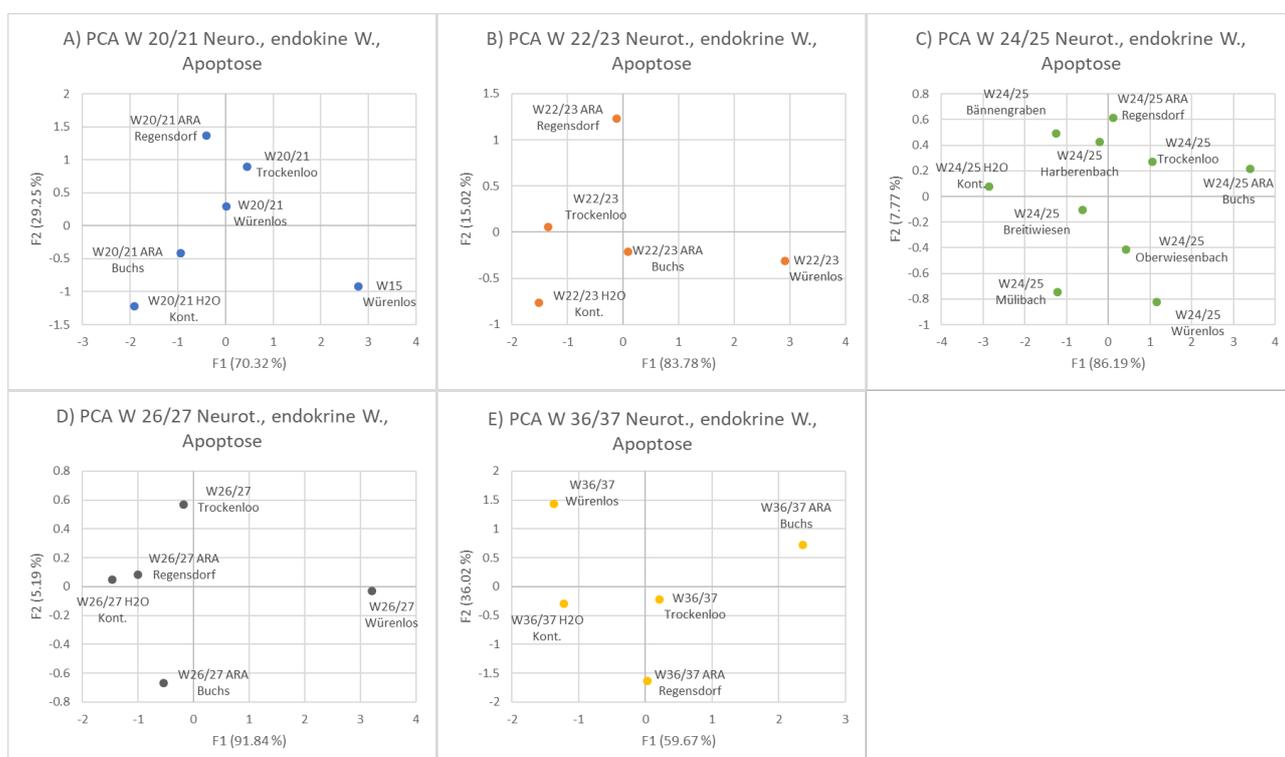


Abbildung 29. Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker für Neurotoxizität, endokrine Wirkung und Apoptose für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Dargestellt sind A) PCA Ergebnisse W 20/21, B) PCA Ergebnisse W 22/23, C) PCA Ergebnisse W 24/25, D) PCA Ergebnisse W 26/27 und E) PCA Ergebnisse W 36/37.



## 6 ANMERKUNG

Die Aussagekraft der Genexpressionsanalyse könnte mittels Korrelation von Daten einer Begleitanalytik oder anderen gemessenen Wasserparametern verstärkt bzw. bestätigt werden.

Wallisellen, 23.07.2020

aQuaTox-Solutions GmbH

Dr. Stephan Fischer

