

Wirkungsbezogene Detektion von toxischen Substanzen in Fisch und Umwelt

Effect-related detection of toxic substances in fish and environment

Ulrike Kammann¹; Martin Klempt²

¹ Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Palmaille 9, 22767 Hamburg, Germany

² Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Forschungsbereich Fischqualität, Palmaille 9, 22767 Hamburg, Germany
ulrike.kammann@ifo.bfa-fisch.de

Das Aufspüren unbekannter und die Quantifizierung bekannter toxischer Substanzen ist eine Herausforderung für die moderne chemische und biologische Analytik. Der Einsatz der wirkungsbezogenen Detektion mit zellbasierten Systemen, die z. B. mit Östrogen- oder AH-Rezeptor-vermittelten Wirkungen arbeiten, bietet eine Reihe von Vorteilen (u. a. Zeit- und Geldersparnis) gegenüber der klassischen chemischen Analytik. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene, gentechnisch veränderte Zellarten mit demselben Rezeptor unterschiedlich empfindlich auf 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) reagieren. Einsatzmöglichkeiten und Grenzen dieser Methoden in der Umwelt und Lebensmittelanalytik werden diskutiert.

Wie analysiert man toxisch wirkende Substanzen?

Der klassische Weg ist die chemische Analytik, mit deren Hilfe Einzelsubstanzen nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Das sind aber nur diejenigen, die man von vornherein in der Probe vermutet hat und nach denen über den Vergleich mit Standards gezielt gesucht wurde. Mit chemischen Suchverfahren (z. B. *non-target screening*) kann nach Substanzen gefahndet werden, die bisher nicht im Blickfeld des Analytikers lagen und so bei der konventionellen Analyse nicht erfasst werden. Aber auch beim *non-target screening* ist das Stoffspektrum durch apparative Randbedingungen begrenzt – die Methoden sind aufwändig, teuer und daher ungeeignet für den Routinebetrieb. Darüber hinaus ist die Gefahr, die entscheidenden Substanzen zu übersehen, immer gegeben.

Effect-related detection of toxic substances

The detection of unknown and the quantification of known toxic substances is a challenge for the modern chemical and biological analysis. Effect-related in vitro methods, e.g. AH-receptor or estrogen-receptor mediated, offer some advantages compared to the classical chemical analysis. It could be shown that two cell lines exhibit different sensitivities to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), although the cells contain the identical dioxin-receptor. The application and limitations of these methods in environmental analysis are discussed.

Durch die Kombination verschiedener biologischer Zellsysteme miteinander oder durch die Kombination von biologischen und chemischen Analysen können die Vorteile beider Systemarten genutzt werden. Der Nachweis von toxischen Wirkungen gelingt in Zellsystemen oft schneller als mit Hilfe klassischer analytischer Methoden, da Zellsysteme meist geringere Anforderungen an die Probenaufreinigung stellen. Ebenso können durch „biologisches Screening“ Kosten eingespart werden: Beispielsweise belaufen sich die Kosten für die Analyse einer Fischprobe auf Dioxine und dioxinähnliche PCBs auf etwa 800 bis 1500 Euro, wobei routinemäßige Analysen mit dem biologischen System für etwa 100 Euro pro Probe durchführbar sind. Für Proben ohne biologische Wirkung kann die teure chemische Analytik entfallen.

Grundsätzlich kann man mit in-vitro-Methoden wie folgt vorgehen: Anhand von allgemeinen Untersuchungen an empfindlichen Zellen wird nachgewiesen, ob sich eine toxische Substanz in der Probe befindet. In weiteren Schritten wird dann die Art der toxischen Substanz mit spezifischen Zellsystemen bestimmt und ggf. quantifiziert. Ist die Art der schädlichen Substanz von vornherein bekannt, so kann sofort die spezifische und quantitative Untersuchung vorgenommen werden. Vom biologischen Standpunkt aus betrachtet ist es in erster Linie interessant, welches schädliche Potential eine Probe hat. Welche Stoffe dieses schädliche Potential vermitteln, ist dagegen von juristisch-legislativem Interesse.

Detektion allgemeiner Wirkungen

Bei allgemeinen Toxizitätstests werden nicht einzelne Wirkstoffe nachgewiesen, sondern die Wirkung aller in der Probe enthaltenen Substanzen auf die Zelle. Ein wesentlicher toxischer Effekt, der oft für den Nachweis allgemeiner Toxizität verwendet wird, ist die Integrität der Zellmembran, die mikroskopisch erfasst werden kann. Zellen, die z. B. von Trypanblau angefärbt werden, d. h. deren Zellmembran für den Farbstoff durchlässig ist, erscheinen unter dem Mikroskop blau und können so von den Zellen unterschieden werden, deren Membran noch intakt ist und den Farbstoff nicht passieren lässt. Es besteht auch die Möglichkeit, strikt intrazelluläre Enzyme im Medium nachzuweisen, um Membranschäden zu detektieren.

Detektion von Rezeptor-vermittelten Wirkungen

Die Eigenschaft von Zellen mit definierten Substanzen Verbindungen einzugehen wird auch in der Analyse von möglichen Toxinen genutzt. Je nach Art der Zelle binden verschiedenen Substanzen an die zelleigenen Strukturen (Rezeptoren). Dadurch verändern sich die Rezeptoren so, dass sie nach dieser Bindung eine Zellantwort veranlassen. Diese Zellantworten sind so zahlreich und verschieden wie es Substanzen und Zellen gibt. Man kann davon ausgehen, dass bei den hier zur Diskussion stehenden wirksamen Substanzen eine Beeinflussung der Genexpression stattfindet: Nach der Bindung der Substanz an den Rezeptor kommt es über mehrere Zwischenschritte zu einer An- oder Abschaltung eines Gens. Dadurch wird eine Boten-RNA gebildet, die von der Zelle in ein Protein übersetzt wird. Dieses Protein wird dann direkt oder indirekt gemessen (Abb. 1).

Wie beschrieben steht am Anfang der Reaktionskaskade die Bindung der Substanz an den Rezeptor und die daran anschließende Strukturänderung des Komplexes. Es ist jedoch möglich, dass Substanzen an den Rezeptor binden, ohne zu einer Strukturänderung zu führen. Sie blockieren dann den Rezeptor für andere Stoffe und machen Zellen unter Umständen sogar unempfindlich gegen den gesuchten Stoff. Es ist es auch möglich, dass die Kaskade von zusätzlichen Stoffen positiv oder negativ beeinflusst werden. Bei der Durchführung solcher Analysen sind also zunächst mögliche Störfaktoren zu identifizieren und zu berücksichtigen.

Falls die Zellen in einer dosisabhängigen Weise reagieren, kann dieses Zellsystem auch zur Quantifizierung der Substanz verwendet werden. Allerdings muss man berücksichtigen, dass spezifische Zellsysteme die integrierte Antwort aller enthaltenen wirksamen Substanzen anzeigen, auch der unbekannten. Um spezifische Reaktionen messen zu können, werden neben der unveränderten Zelllinie auch gentechnisch veränderte verwendet. Bei diesen Zellen wird ein leicht nachzuweisendes Protein durch die Behandlung mit einem Wirkstoff exprimiert.

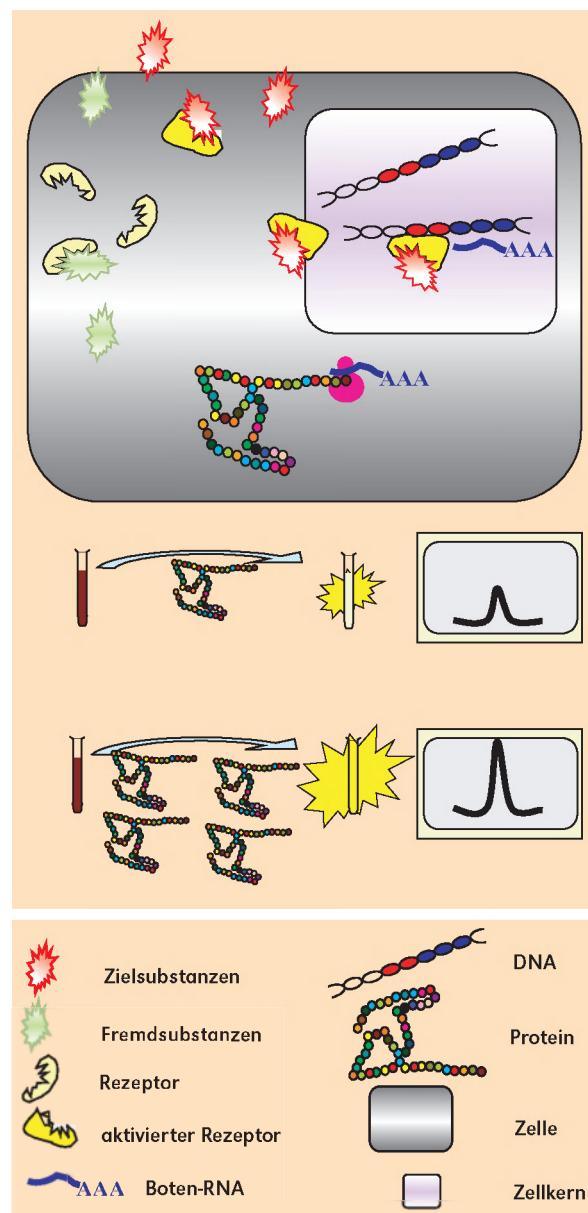


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten Antwort einer Zelle. Die Zellantwort (in diesem Falle die Bildung eines Proteins) kann auch zur Quantifizierung (gelbes Licht) der zu messenden Zielsubstanz Verwendung finden.

Schematic drawing of a receptor-mediated response (here: protein synthesis) of a cell. The amount of protein is used for quantification (yellow light).

Entscheidend bei der Konstruktion solcher Zellen ist, welche Expressions-regulierenden DNA-Elemente für die messbare Reaktion der Zellen herangezogen werden. Notwendig zur Konstruktion solcher Zellen ist die genaue Kenntnis der Signalübertragungswege.

Dioxin-wirksame Substanzen

Polychlorierte Dibenz-p-dioxine und Dibenzofurane sowie dioxinähnliche polychlorierte Biphenyle (PCBs) sind toxische Substanzen, die als krebsfördernd eingestuft werden. Alle diese Substanzen haben im Wesentlichen

denselben, über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AH-Rezeptor) verlaufenden Wirkmechanismus. Bisher werden zur Überprüfung der Grenzwerte von Dioxinen und ähnlichen Substanzen in Lebensmitteln aufwändige und kostenintensive gaschromatographisch-massen-spektroskopische (GC/HRMS) Methoden verwendet, welche die Konzentrationen der Substanzen im Ultra-spurenbereich bestimmen können. So wird jede Substanz in ihrer Konzentration exakt erfasst. Vom toxikologischen Standpunkt aus ist die Wirkung aller in der Probe vorhandenen Dioxin-wirksamen Substanzen zusammen die entscheidende Größe. Um eine Maßzahl dafür zu erhalten, müssen die Substanzen entsprechend Ihrer Toxizität verschieden gewichtet werden. Die Toxizität der Probe wird dazu relativ zu 2,3,7,8-TCDD angegeben. Diese summarische (biologische) Berechnung der Wirkung wird mit Hilfe von Toxizitäts-Äquivalent-Faktoren (TEF) durchgeführt. Die Lebensmittel-Grenzwerte sind bereits in Toxizitätsäquivalenten angegeben. Leider ist sowohl für GC/HRMS als auch für Zellsysteme eine zeitaufwändige Isolierung der Dioxine aus der Probenmatrix unverzichtbar. Der Zeitvorteil eines Screenings mit biologischen Methoden wird dadurch relativiert.

Zellbasierte Testsysteme für Dioxine verwenden die bisher bekannten Stoffwechselwege des Dioxins und gehen dabei davon aus, dass sowohl Dioxine als auch Furane und PCBs identische Mechanismen initiieren: Zunächst bindet der Fremdstoff an den intrazellulären AH-Rezeptor. Dieser Komplex wird nach Anlagerung weiterer Proteine in den Zellkern transportiert, wo er an eine spezifische DNA-Sequenz (*Dioxin Responsive Element*) bindet. Durch diese Bindung wird ein auf der DNA stromabwärts liegendes Gen angeschaltet und ein Protein wird von der Zelle produziert (Abb. 1).

Eines der produzierten Proteine ist zum Beispiel das Enzym Cytochrom P450 1A1. Die Menge dieses Enzyms kann indirekt durch die Umsetzung eines Modellsubstrats

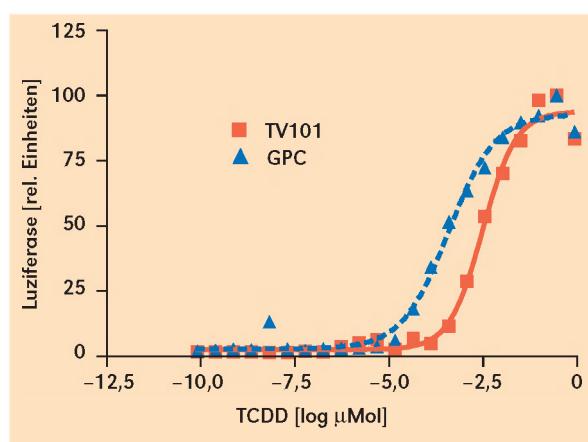


Abbildung 3. Dosis-Wirkungsbeziehung von 2,3,7,8-TCDD im CALUX-Assay mit TV101 und GPC Zellen nach 24 h Exposition.

Dose response curve of 2,3,7,8-TCDD derived from the CALUX assay using TV101 and GPC cells after 24 h exposure.

(Ethoxresorufin-O-deethylase; EROD) fluorimetrisch über die Bildung von Resorufin bestimmt werden. Permanente Ratten- (H4IIE), Mensch- (HepG2; Abb. 2) oder Fischzellen (RTG-2) produzieren dies Enzym und können im Labor kultiviert und in Zellkulturschalen angezüchtet werden. Die Exposition mit der Probe erfolgt direkt in den Zellkulturschalen. Eine weitere Möglichkeit AH-Rezeptor-vermittelte Wirkungen zu erfassen, stellt die Verwendung gentechnisch veränderter Zellkulturen dar (Garrison et al. 1996). Diese Assays, zu denen auch der bekannte CALUX-Assay zählt, basieren in der Regel auf gentechnisch veränderten Zelllinien, in die ein DNA-Konstrukt eingebaut wird. Dieses DNA-Konstrukt enthält neben einem oder mehreren *Dioxin Responsive Elements* das leicht nachzuweisende Luziferasegen. Vergleichbar zu den oben beschriebenen Reaktionskaskaden binden die Dioxin-wirksamen Substanzen an den AH-Rezeptor dieser Zellen und induzieren die Expression des Luziferase-Gens über das *Dioxine responsive Element*. Die Menge an dadurch in der Zelle produzierter Luziferase ist in weiten Bereichen proportional zur Dioxinkonzentration in der Probe und kann über eine enzymatische Reaktion am Luminometer quantifiziert werden. Die Methode ist so empfindlich, dass ähnlich niedrige Nachweisgrenzen wie mit GC-HRMS erreicht werden.

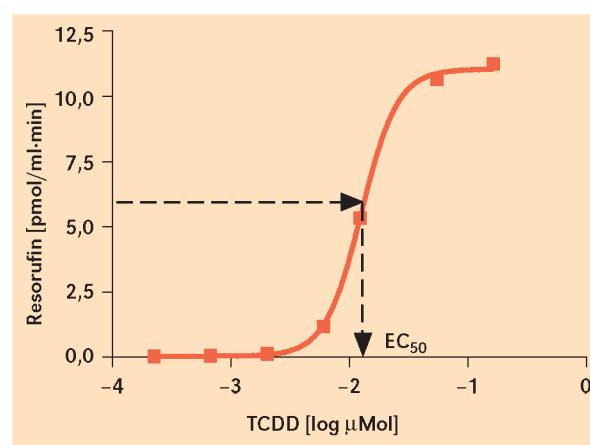


Abbildung 2: Dosis-Wirkungsbeziehung von 2,3,7,8-TCDD im EROD-Assay mit HepG2 Zellen nach 48 h Exposition. Durch Pfeile angedeutet die Ermittlung der EC₅₀.

Dose response curve of 2,3,7,8-TCDD derived from the EROD assay using HepG2 cells after 48 h exposure. Arrows indicate EC₅₀.

Die Sensitivität und die Selektivität der gentechnisch veränderten Zellen sind sowohl von den Eigenschaften des eingebauten Genkonstrukt, als auch von der Empfängerzelle und dem Ort des Einbaus abhängig. Als Beispiel sind in Abbildung 3 die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten von identischen Dioxinkonzentrationen auf zwei unterschiedliche Zelltypen dargestellt. Beide Leberzelllinien reagieren auf die Exposition mit geringen Konzentrationen TCDD (maximal 1,2 µMol) mit der Expression von Luziferase, jedoch in unterschiedlicher Empfindlichkeit. Die meerschweinchenspezifische GPC-2dLuc (Gasiewicz et al. 1996) reagiert deutlich empfindlicher auf die Belastung mit

Tabelle 1: Eigenschaften der gentechnisch veränderten Zelllinien – *Properties of genetically modified cell lines.*

	GPC.2D.Luc	TV101
Ursprungszelle (Organismus)	GPC.16 (Meerschwein)	HepG2 (Mensch)
Konstrukt	p2DLuc	pL1A1N
Eigenschaften	2 konsensuale <i>Dioxin responsive</i> Elements mit Minimal Chicken Ovalbumin in pGL2	-1612 Promoter, Exon1, tlws. Intron1+292 des humanen Cyp1a1 in pSVO
Literatur	Zhou et al. 2003; Gasiewicz et al. 1996	Postlind et al. 1993

2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin als die auf der humanen Zelllinie beruhende TV101 (Postlind et al. 1993). Der Unterschied in der Empfindlichkeit der in Abb. 3 dargestellten Zellen ist etwa 8-fach.

Neben den Ursprungszellen unterscheiden sich die dargestellten rekombinanten Zelllinien auch durch die verschiedenen DNA-Sequenzen (Konstrukt), die in die jeweiligen Zellen eingebracht worden sind. In Tabelle 1 sind beispielhaft die Konstrukte und einige Eigenschaften der verwendeten Zellen dargestellt. Es ist festzuhalten, dass Erkenntnisse, die mit einer Zelllinie gewonnen wurden, sich nicht unbedingt auf eine andere Zelllinie übertragen lassen, insbesondere wenn andere Substanzen als reines 2,3,7,8-TCDD in der Probe vorhanden sind.

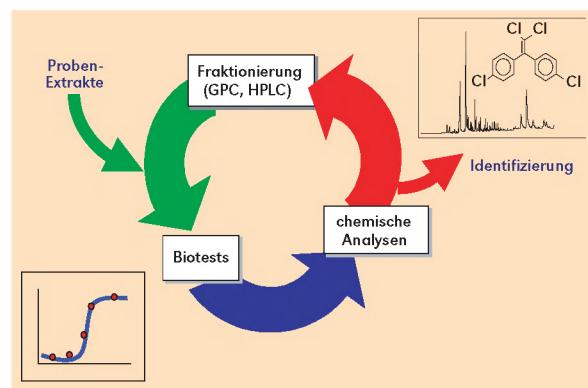
Östrogen-wirksame Substanzen

Substanzen mit hormoneller Aktivität (z. B. Bisphenol A, Phthalate, Methoxychlor, Alkylphenole, 17 β -Estradiol, Testosteron und Progesteron) weisen unterschiedliche molekulare Strukturen auf, die verschiedene Analysetechniken erforderlich machen. Eine gemeinsame Probenvorbereitung wie etwa bei Dioxinen und PCBs ist bei den Östrogen-wirksamen Substanzen nicht möglich. Demzufolge können mit Hilfe chemischer Analysen unbekannte hormonaktive Substanzen kaum identifiziert werden, zumal deren Konzentrationen in Umweltproben meist unmittelbar an der Nachweisgrenze liegen aber dennoch biologisch relevant sind. Stattdessen werden vermehrt biologische Testsysteme herangezogen, welche die Wirkung der Substanzen (östrogene und antiöstrogene bzw. androgene und antiandrogene Aktivität) als Summenparameter erfassen. Als Beispiel ist hier der sogenannte *Yeast Estrogen Screen* eingesetzt. Dieser Test basiert auf der Verwendung von genetisch veränderten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), welche speziell für den Nachweis Östrogen-aktiver Substanzen kloniert wurden (Rehmann et al. 1999). Werden diese Hefezellen mit Östrogen-aktiven Substanzen belastet, so bindet diese Substanz an den humanen Östrogen-Rezeptor (hER), welcher in den Hefezellen exprimiert wird. Nach der Dimerisierung mit einem zweiten Xenoöstrogen-hER-Komplex kommt es zur Bindung an einen Abschnitt auf der DNA, welcher als sogenanntes *Estrogen Responsive Element* die Transkription nachgeschalteter Gene reguliert, in diesem

Fall eines Reportergens, welches für die β -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym wird von den Hefezellen in das Kulturmedium abgegeben. Die freigesetzte Menge an Enzym setzt ein Substrat um, und das Reaktionsprodukt kann photometrisch bestimmt werden.

Wirkungsbezogene Detektion in der Umweltanalytik

Umweltanalytik kann auch mit einer Kombination von chemischen und biologischen Methoden betrieben werden: Die sogenannte biotestgeleitete chemische Analytik beruht auf dem TIE-Verfahren (*Toxicity Identification Evaluation*), welches vor ca. 20 Jahren ursprünglich für Abwasser entwickelt wurde (Schuetzle und Lewtas 1986). Hierbei werden chemische Fraktionierungsverfahren mit toxikologischen Tests so kombiniert, dass die biologischen Ergebnisse den Verlauf der chemischen Untersuchungen bestimmen (Abb. 4). Ein oder mehrere biologische Tests leiten damit die Fraktionierung der Probe. Nur die toxischen Fraktionen werden weiter untersucht und aufgetrennt, so dass am Ende die biologische Wirkung auf wenige Substanzen in der Fraktion eingegrenzt werden kann. Die komplexe chemische Zusammensetzung von Umweltproben erschwert die Zuordnung von Substanzen zu den toxischen Effekten. Zu der analytischen Herausforderung der Identifizierung von Substanzen kommt die Problematik der Kombinationswirkungen, die in der Mischung zu anderen Effekten führen können

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biotest-geleiteten Fraktionierung – *Schematic drawing of biotest-directed fractionation.*

als die Einzelsubstanzen allein. Dieser Problematik wirkt die selektive Fraktionierung entgegen: Verliert sich ein biologischer Effekt durch die Fraktionierung oder kommt ein biologischer Effekt erst durch die Fraktionierung zu stande, so liegt vermutlich eine Wirkungsbeeinflussung verschiedener Substanzen untereinander vor. Biotestgeleitete Fraktionierungen sind inzwischen in vielfältigen Variationen nicht nur auf Abwasser, sondern auch auf Sedimentextrakte angewendet worden (z. B. Brack et al. 2002; Kammann et al. 2005).

Grenzen der in-vitro-Methoden

Das Problem der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus in-vitro-Versuchen auf Aussagen zum gesamten Organismus ist allgemein bekannt. Stoffe, die im Laborversuch die Membran einer isolierten Leberzelle leicht durchdringen, werden im Organismus unter Umständen gar nicht aufgenommen und entfalten daher keine toxische Wirkung. Der Metabolismus eines Organs wie der Leber kann in Zellkulturen immer nur unvollständig abgebildet werden: Stoffe, die im Organismus schon durch Enzyme abgebaut worden sind bevor sie toxisch wirken, sind ebenso denkbar wie Substanzen, die erst in Form ihrer metabolisch entstandenen Abbauprodukte wirksam werden. Man muss sich darüber im Klaren sein, dass in-vitro-Methoden nur Modellsysteme sind, die selektiv die Summe bestimmter Wirkungen oder Stoffgruppen anzeigen und damit nur einen Ausschnitt aller in der Probe vorhandenen Substanzen. In-vitro-Methoden sind ihrem Wesen nach Kurzzeittest, mit denen Aussagen über chronische Schädigungen kaum zu treffen sind. Trotz dieser Grenzen sind in-vitro-Methoden wertvolle Hilfsmittel in der Toxikologie und können eine ganze Reihe von Tierversuchen ersetzen. So wurden z. B. mit der im Januar 2005 in Kraft getretenen Novelle des Abwasserabgabegesetzes (AbwAG) der bisher übliche Goldorfen-Fischtest durch einen in-vitro-Test mit Fischeiern ersetzt. Die Aussagekraft und die Zuverlässigkeit beider Tests sind vergleichbar (BMU 2004). Dieser Fischei-Test ist im Institut für Fischereiökologie etabliert und wird für toxikologische Fragestellungen eingesetzt (Vobach und Kammann 2003).

Ausblick

Im Trend liegen derzeit Methoden aus den Bereichen Proteomics und Genomics, deren erfolgreiche Anwendung etwa in Verbindung mit der Chip-Technologie aber ganz entscheidend von der Kenntnis der zu untersuchenden Proteine bzw. Gene abhängt. Das Sequenzieren im Bereich Genomics entwickelt sich ständig weiter: Bereits im Mai 1997 war das erste Genom eines eukaryotischen Organismus, der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*, aufgeklärt. Inzwischen sind unter anderem das Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster*, des Kugelfisches *Fugu rubripes* und des Zebrabärblings *Danio rerio* sequenziert. Auch das Genom von Mensch, Maus, Ratte und anderen

Säugertieren ist aufgeklärt. Von den meisten Fischarten ist dagegen weniger bekannt, aber mehrere internationale Gruppen arbeiten bereits an diesem Thema (z. B. Williams et al. 2003).

Der Weg zu einem ganzheitlichen Verständnis komplex miteinander verbundener zellulärer Systeme (Systembiologie) ist nur mit den modernen biologischen Methoden und entsprechender Datenverarbeitung denkbar. Auch für chemische Fragen nach der stofflichen Zusammensetzung einer Probe können biologische Systeme nützlich sein. Zellbasierte Systeme werden in Zukunft die Chemie immer besser unterstützen und ergänzen.

Zitierte Literatur

BMU, 2004: Pressedienst Nr. 335/04, Berlin, 26. November 2004.

Brack, W.; Schirmer, K.; Kind, T.; Schrader, S.; Schürmann G., 2002: Effect-directed fractionation and identification of cytochrome P 450 1A-inducing halogenated aromatic hydrocarbons in a contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (12): 2654–2662.

Garrison, P. M.; Tullis, K.; Aarts, J. M.; Brouwer, A.; Giesy, J. P.; Denison, M.S., 1996: Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like chemicals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30 (2): 194–203.

Gasiewicz, T. A.; Kende, A. S.; Rucci, G.; Whitney, B.; Willey, J. J., 1996: Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1787–1803.

Kammann, U.; Biselli, S.; Reineke, N.; Wosniok, W.; Danielszewski, D.; Hühnerfuss, H.; Kinder, A.; Sierts-Herrmann, A.; Theobald, N.; Vahl, H. H.; Vobach, M.; Westendorf, J.; Steinhart, H., 2005: Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the North and Baltic Sea - Part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index. *J. Soils & Sediments* 5(4): 225–232.

Postlind, H.; Vu, T. P.; Tukey, R.H.; Quattrochi, L. C., 1993: Response of human CYP1-luciferase plasmids to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118 (2): 255–62.

Rehmann, K.; Schramm, K. W.; Kettner A. A., 1999: Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere.* 38: 3303–3312.

Schuetzle, D.; Lewtas, J.; 1986: Bioassay-directed chemical analysis in environmental research, *Anal. Chem.* 58 (11): 1960–1975.

Vobach, M.; Kammann, U., 2003: Der Fischei-Test – Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen, *Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch.* 50 (3): 126–130.

Williams, T. D.; Gensberg, K.; Minchin, S. D.; Chipman, J. K., 2003: A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*), *Aquatic. Toxicol.* 65: 147–157.

Zhou, J. G.; Henry, E. C.; Palermo, C. M.; Dertinger, S. D.; Gasiewicz, T. A., 2003: Species-specific transcriptional activity of synthetic flavonoids in guinea pig and mouse cells as a result of differential activation of the aryl hydrocarbon receptor to interact with dioxin-responsive elements. *Mol. Pharmacol.* 63: 915–924.