

**Synopse zu Wirkungsmechanismen  
von Spurenstoffen im  
Säugerorganismus als Grundlage der  
Bewertung des Wirkungspotenzials  
von Stoffsummen und der Erkennung  
„neuer“ toxischer Endpunkte**



UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES  
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,  
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 3708 61 205  
UBA-FB 001512

**Synopse zu Wirkungsmechanismen  
von Spurenstoffen im  
Säugetierorganismus als Grundlage der  
Bewertung des Wirkungspotenzials von  
Stoffsummen und der Erkennung  
„neuer“ toxischer Endpunkte**

von

**Ali Taghavi,  
Dr. Karin Heine,  
Dr. Fritz Kalberlah**  
Forschung- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG),  
Freiburg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

**UMWELTBUNDESAMT**

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.uba.de/uba-info-medien/4150.html> verfügbar. Hier finden Sie auch eine Kurzfassung.

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

ISSN 1862-4804

Durchführung der Studie:	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG) Klarastr. 63 79106 Freiburg
Abschlussdatum:	März 2010
Herausgeber:	Umweltbundesamt Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau Tel.: 0340/2103-0 Telefax: 0340/2103 2285 E-Mail: <a href="mailto:info@umweltbundesamt.de">info@umweltbundesamt.de</a> Internet: <a href="http://www.umweltbundesamt.de">http://www.umweltbundesamt.de</a> <a href="http://fuer-mensch-und-umwelt.de/">http://fuer-mensch-und-umwelt.de/</a>
Redaktion:	Fachgebiet II 3.6-D Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers Hermann H. Dieter

Dessau-Roßlau, August 2011

## Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 001512	2.	3.
4. Titel des Berichts <b>Synopse zu Wirkungsmechanismen von Spurenstoffen im Säugerorganismus als Grundlage der Bewertung des Wirkungspotenzials von Stoffsummen und der Erkennung „neuer“ toxischer Endpunkte</b>		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Taghavi, Ali Heine, Karin Kalberlah, Fritz	8. Abschlussdatum 31. März, 2010	9. Veröffentlichungsdatum August 2011
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG) Klarastrasse 63 79106 Freiburg	10. UFOPLAN-Nr. FK 3708 61 205	11. Seitenzahl 208
	12. Literaturangaben 411	13. Tabellen und Diagramme 11
	14. Abbildungen 61	7. Fördernde Institution (Name, Anschrift)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau
15. Zusätzliche Angaben Kapitel 4 (Möglichkeiten der Nutzung der Struktur-Wirkungsanalyse zur Erkennung "neuer" toxischer Endpunkte bei Fremdstoffen) wurde von Prof. Dr. Klaus Kümmerer, EDC Chemical Consulting, Martin Luther Straße, 79341 Kenzingen, im Unterauftrag bearbeitet		
16. Kurzfassung Die Studie behandelt die Frage der Integration von Erkenntnissen zu Wirkmechanismen von Chemikalien auf biochemischer oder zellulärer Ebene in die regulatorische Toxikologie, insbesondere in Hinblick auf Aussagen zu „neuen“ Endpunkten und zu Fremdstoffgemischen. Wichtige biochemische Prozesse im Säugerorganismus werden beschrieben (z.B. Transportprozesse, Signaltransduktion) und deren Störung durch Fremdstoffe erläutert. Solche Störungen physiologischer Prozesse werden als „Toxizitätspfad“ charakterisiert. Bei „neuen“ toxikologischen Endpunkten handelt es sich um solche nachteilige Wirkungen, die in bestehenden klassischen OECD-Tests, wie sie derzeit in der Chemikalienprüfung vorgeschrieben sind,		

nicht oder nur unzureichend entdeckt werden können. An den Beispielen neurodegenerativer Erkrankungen, verzögerter immuntoxischer Effekte und Auswirkungen des Alterns werden solche „neuen“ Endpunkte beschrieben, und Toxizitätspfade erläutert, die mit diesen Wirkungen in Verbindung stehen. Die Erkenntnisse ermöglichen die Hypothesenbildung, dass bestimmte Chemikalien analog über diese Toxizitätspfade wirken, ohne dass dies bisher in üblichen Stoffbewertungen geprüft worden wäre. Mittels eines solchen Screeningverfahrens können nachfolgend gezielte Testungen Aussagen zum Einfluss dieser Stoffe auf die neuen Endpunkte ermöglichen.

Mit dem gleichen Grundansatz (Beschreibung eines Toxizitätspfades durch ähnlich oder komplementär wirkende Stoffe) ist auch die gezieltere Diskussion von Kombinationswirkungen möglich. Die Studie liefert entsprechende Beispiele, wobei auch die Grenzen dieser Herangehensweise beschrieben werden.

Die toxikologische Risikoabschätzung mittels der Betrachtung von Toxizitätspfaden ist ein Gedanke, der zurzeit auch in den USA von der amerikanischen Umweltbehörde EPA intensiv verfolgt wird. Die Herangehensweise setzt die Nutzung enormer Datenmengen über die jeweils relevanten biochemischen und zellulären Prozesse und deren Interaktion voraus, die z.B. über „High Throughput Screening“ Verfahren wie „Genomics“ generiert und mit stoffkinetischen sowie endpunktbezogenen Aussagen verknüpft werden. Beispiele werden unter anderem im Projekt TOXCAST berichtet. Die Nutzung von Software zur (quantitativen) Struktur-Wirkungsanalyse ((Q)SAR) kann hier einen Beitrag leisten, ist jedoch bei neuen Endpunkten noch nicht nutzbar, da keine validierten Datensätze (größere Anzahl abgesicherter Stoff-Wirkungszusammenhänge) für solche Wirkungen vorliegen.

In der Schlussfolgerung wird die Bedeutung dieses neuen Ansatzes in der regulatorischen Toxikologie hervorgehoben, konkrete Hinweise für die Testung von oben gewonnenen Hypothesen zu einzelnen neuen toxikologischen Endpunkten gegeben, und Schritte vorgeschlagen, mittels derer der hier geschilderte Ansatz besser in der Stoffbewertung verankert werden kann. Zugleich wird deutlich, dass das Denken in Toxizitätspfaden unter Nutzung von Tests auf biochemischer Ebene (z.B. in vitro-Verfahren) derzeit keinen vollständigen Ersatz für die erforderlichen tierexperimentellen Toxizitätstests darstellen kann.

17. Schlagwörter

Risikoabschätzung, regulatorische Toxikologie, Gemisch, Toxizitätspfad, (Q)SAR, neurodegenerative Erkrankung, Immuntoxizität, Altern, tierexperimentelles Testverfahren, endpunktbezogener Test, Wirkprinzip, Wirkmechanismus, Durchdurchsatz-Screening (HTS), REACH

18. Preis	19.	20.
-----------	-----	-----

## Report Cover Sheet

1. Report UBA-FB 001512	No. 2.	3.
4. Report Title  <b>Synopsis of effect mechanisms by low dosed xenobiotics on mammalian organisms as a basis to assess aggregated effects of chemical mixtures and to detect “new” toxicological endpoints</b>		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Taghavi, Ali Heine, Karin Kalberlah, Fritz		8. Report Date March, 31, 2010
6. Performing Organisation (Name, Address)  Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG) Klarastrasse 63 79106 Freiburg Germany		9. Publication Date August 2011
7. Sponsoring Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau		10. UFOPLAN-Ref. No. FK 3708 61 205
7. Sponsoring Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau		11. No. of Pages 208
7. Sponsoring Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau		12. No. Of Reference 411
7. Sponsoring Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau		13. No. of Tables, Diagrams 11
7. Sponsoring Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau		14. No. of Figures 61
15. Supplementary Notes  Chapter 4 (Chances to use (quantitative) structure activity relationship (Q)SAR in order to detect „new“ toxic endpoints induced by xenobiotics) was subcontracted and prepared by Prof. Dr. Klaus Kümmerer, EDC Chemical Consulting, Martin Luther Straße, 79341 Kenzingen, Germany.		
16. Abstract  This report addresses the question, how to integrate information on a chemicals mechanistic mode of action at the biochemical or cellular level into the framework of regulatory toxicology. One focus is to enable toxicologists to make statements concerning „new“ endpoints and mixtures of chemical substances by the use of mechanistic data. Some relevant biochemical processes in mammals organism are described (e.g, transport processes, signal transduction) and disturbances of these processes by xenobiotics are provided. Such disturbances of biological processes by chemicals are characterised as “toxicity pathways”.  „New“ toxicological endpoints are adverse effects, which may not or not easily be detected by current classical OECD tests, which are demanded in actual substance assessments and regulatory processes.		

Examples are neurodegenerative diseases, specific delayed immunotoxic effects, and the process of ageing. We provide examples of chemical substances with their toxicity pathways linked to those new endpoints. From that we can hypothesise that other chemicals, which are not yet tested with regard to a specific toxicity pathway described, may also be involved in this. In consequence, a more target-oriented and tailored testing of suspected chemicals to validate the hypothesis will be possible.

The same basic approach (i.e. to describe a toxicity pathway, which is triggered by similarly or complementary acting substances) was also used to describe adverse effects of mixtures. Examples are provided and limitations of this approach are discussed.

The idea to integrate “toxicity pathway” considerations into toxicological risk assessment is also followed by the Environmental Protection Agency (EPA) in the US. The approach demands the use of enormous amounts of data on the relevant biochemical and cellular processes and interactions, which are generated, e.g. by “high throughput screening” including “genomics” testing results and which are linked to substance specific kinetic data and experimental apical test outcomes. Examples are provided, e.g. from the TOXCAST project initiative. The use of (quantitative) structure activity relationship ((Q)SAR) software may, in principle, be helpful. However, (Q)SAR tools may not yet be used for new endpoints, because no large validated data sets with regard to these endpoints are currently available.

In conclusion, the report emphasises the importance of the new approaches in the framework of regulatory toxicology. Specific proposals how to test whether some example substances really act via a hypothesised toxicity pathway, are provided. Specific implementation measures are proposed to integrate the approach in toxicological risk assessment. However, it is acknowledged that thinking in terms of “toxicity pathways” and the use of tests at the biochemical level (e.g., the use of in vitro-testing) may currently not fully substitute experimental animal testing.

#### 17. Keywords

risk assessment, regulatory toxicology, mixture, toxicity pathway, (Q)SAR, neurodegenerative disease, immunotoxicity, ageing, animal testing, apical test result, mode of action, effect mechanism, high throughput screening (HTS), REACH

18. Price

19.

20.

## Inhalt

<b>0</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>Toxizitätspfade – Biochemische und zelluläre Ereignisse als Grundlage toxischer Wirkungen von Fremdstoffen</b> .....	<b>35</b>
1.1	Einleitung.....	35
1.2	Stoffwechselprozesse.....	38
1.2.1	Energiehaushalt: Produktion von Adenosintriphosphat (ATP).....	38
1.2.2	Enzyminhibitoren.....	39
1.3	Transportvorgänge.....	44
1.3.1	Transportproteine.....	45
1.3.2	Passiver Transport.....	46
1.3.3	Aktiver Transport.....	47
1.4	Chemische Signaltransduktion.....	51
1.4.1	Extrazelluläres Signal.....	52
1.4.2	Rezeptor.....	54
1.4.3	Signalweitergabe und zelluläre Reaktion.....	55
<b>2</b>	<b>Erkennung „neuer“ toxischer Endpunkte bei Fremdstoffen über die Analyse von Toxizitätspfaden – Beispiele</b> .....	<b>58</b>
2.1	2-Alkenale und Neurodegeneration.....	58
2.1.1	Einleitung.....	58
2.1.2	Endogene 2-Alkenalbildung als Zwischenstufe bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit.....	59
2.1.3	Die Neurotoxizität von 2-Alkenalen.....	59
2.1.4	Können 2-Alkenale ins Gehirn gelangen?.....	63
2.1.5	Furanmetaboliten als mögliche neurotoxische Substanzen.....	64
2.1.6	Mithilfe welcher Tests können neurotoxische 2-Alkenale identifiziert werden?.....	68
2.1.7	2-Alkenale und Myokardstörungen.....	68
2.1.8	Zusammenfassung und empfohlene Schritte.....	68
2.2	Xenobiotika und verzögerte allergische Reaktionen.....	69
2.2.1	Einleitung.....	69
2.2.2	Die Bindungsstelle der Glucocorticoide am GC-Rezeptor.....	71
2.2.3	Bestimmung von weiteren Xenobiotika, die einen Steroid-A-Ring besitzen.....	72
2.2.4	NSAID als glucocorticoide Isostere.....	73
2.2.5	Belastung mit Pyrazol-basierten Farbstoffen und deren toxische Wirkung.....	74
2.2.6	Bestimmung weiterer NSAID-ähnlicher Xenobiotika.....	75
2.2.7	Neonicotinoid-Insektizide.....	76

2.2.8	Geeignete Assays für die Bestimmung von GC-wirksamen Xenobiotika .....	77
2.2.9	Diskussion.....	77
2.2.10	Empfohlene Schritte.....	78
2.3	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltschadstoffen im Alter.....	78
2.3.1	Das Endoplasmatische Retikulum als „Werkzeug der Qualitätssicherung“ .....	78
2.3.2	Alterungsprozesse des Endoplasmatischen Retikulums.....	79
2.3.3	Veränderungen der Calcium-abhängigen Signaltransduktion.....	80
2.3.4	Blei-induzierte Stresswirkungen im ER von Zellen des Nervensystems .....	81
2.3.5	Extrapolation: Induziert Nonylphenol bleiähnliche Stresswirkungen im ER? .....	82
2.3.6	Di-(2-ethylhexyl)phthalat .....	85
2.3.7	Methoxychlor.....	87
2.3.8	Zusammenfassung und Diskussion .....	90
<b>3</b>	<b>Zusammenwirken von Fremdstoffen – Hinweise auf Basis der Toxizitätspfadanalyse.....</b>	<b>93</b>
3.1	Gemische und Ah-Rezeptor vermittelte Effekte.....	93
3.1.1	Einführung.....	93
3.1.2	Historie des Arylkohlenwasserstoff (Ah)- Rezeptors .....	93
3.1.3	Molekulare Mechanismen der Toxizität von Dioxinen und dioxinartigen Chemikalien .....	94
3.1.4	Adverse Effekte.....	95
3.1.5	Die Struktur von Dioxin und dioxinartigen Verbindungen .....	96
3.1.6	Toxische Wirkungen und Symptome von dioxinvermittelter Ah-Rezeptoraktivierung.....	97
3.1.7	REP, TEF und TEQ: Werkzeuge zur Abschätzung der Toxizität von Umweltchemikalien .....	98
3.1.8	Drei Korrekturfaktoren wären für genauere Aussagen mit TEQ Methode erforderlich.....	100
3.1.9	Schlussfolgerungen.....	106
3.2	Bestimmung der Wirkung komplexer Gemische hinsichtlich kardiovasulärer Krankheiten .....	108
3.2.1	Luftverschmutzung und kardiovaskuläre Krankheiten.....	108
3.2.2	Gesundheitliche Effekte von PM bei Langzeitexposition des Menschen.....	109
3.2.3	Biochemische Mechanismen der CVD.....	109
3.2.4	Toxische Wirkungen der Substanzen in luftbürtigen Staubpartikeln .....	115
3.2.5	Zusammenfassung.....	121

3.3	Vorhersagbarkeit quantitativer biochemischer Veränderungen bei Gemischen .....	123
3.3.1	Beispiel 1: CYP-abhängige Enzymveränderungen in der Mäuseleber bei verschiedenen Pestizidgemischen.....	123
3.3.2	Beispiel 2: Hormonwirksame Substanzen .....	126
<b>4</b>	<b>Möglichkeiten der Nutzung der Struktur-Wirkungsanalyse zur Erkennung "neuer" toxischer Endpunkte bei Fremdstoffen.....</b>	<b>129</b>
4.1	Aufgabenstellung .....	129
4.1.1	Endpunkte und Moleküle für QSAR-Berechnungen .....	129
4.1.2	Überprüfung der Prognosen.....	129
4.1.3	Bewertung biochemischer Parameter als Ähnlichkeitskriterien bei QSAR .....	130
4.2	Ergebnisse.....	130
4.2.1	Generelles zur Datenlage und Vorgehensweise .....	130
4.2.2	Struktureigenschaftsbeziehungen .....	130
4.2.3	Für die zu untersuchenden Endpunkte näher betrachtete Software und Modelle .....	133
4.2.4	Rechercheergebnisse und Berechnungen .....	134
4.3	Bewertung biochemischer Parameter als Ähnlichkeitskriterien bei QSAR 145	
4.3.1	Chemieinformatik .....	145
4.3.2	Repräsentation chemischer Moleküle in der Chemieinformatik und QSAR .....	146
4.3.3	Ähnlichkeit von Molekülen.....	147
4.3.4	Mechanismen, Validierungsaspekte, Verfügbarkeit von Modellen .....	149
4.4	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse .....	150
<b>5</b>	<b>Risikoabschätzung unter Berücksichtigung von Toxizitätspfaden: Forschungsaktivitäten, Ansätze zur regulatorischen Umsetzung und Grenzen.....</b>	<b>152</b>
5.1	Die derzeitige Bedeutung mechanistischer Ansätze in der regulatorischen Toxikologie .....	152
5.2	Vergleichende toxikogenomische Datenbank.....	154
5.3	Bericht des National Research Council (2007) und Konzept der U.S. EPA .....	160
5.3.1	Das Konzept.....	163
5.3.2	Diskussion.....	168
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>171</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>175</b>
7.1	Literatur zu Abschnitt 0 .....	175

7.2	Literatur zu Abschnitt 1 .....	175
7.3	Literatur zu Abschnitt 2 .....	179
7.3.1	Literatur zu Abschnitt 2.1 .....	179
7.3.2	Literatur zu Abschnitt 2.2 .....	181
7.3.3	Literatur zu Abschnitt 2.3 .....	183
7.4	Literatur zu Abschnitt 3 .....	187
7.4.1	Literatur zu Abschnitt 3.1 .....	187
7.4.2	Literatur zu Abschnitt 3.2 .....	191
7.4.3	Literatur zu Abschnitt 3.3 .....	199
7.5	Literatur zu Abschnitt 4 .....	199
7.6	Literatur zu Abschnitt 5 .....	201
7.7	Literatur zu Abschnitt 6 .....	202

## Zusammenfassung

### Gegenstand des Forschungsprojekts

Die neue europäische Chemikaliengesetzgebung verlangt die systematische Prüfung von vermarkteten Chemikalien auf gesundheitsrelevante Eigenschaften. Dabei wird überwiegend auf tierexperimentelle Testergebnisse zurückgegriffen, die gesundheitlich nachteilige Wirkungen (oder deren Abwesenheit) beschreiben, ohne dass der dafür zu Grunde liegende Wirkmechanismus notwendigerweise bekannt sein muss. Die Durchführung entsprechender Studien ist jedoch nur schwer vereinbar mit den Prinzipien des Tierschutzes und kann einen extremen finanziellen Aufwand mit sich bringen. Außerdem ist die Aussagekraft limitiert und beinhaltet zwangsläufig wesentliche Lücken:

- Nicht immer ist das Tiermodell geeignet, um alle gesundheitlichen relevanten Wirkungen von Fremdstoffen auf den Menschen (qualitativ und quantitativ) zu erkennen.
- Umfassende Tests werden derzeit in der Regel nur dann verlangt, wenn hohe Tonnagen in Verkehr gebracht werden. Bei geringen Mengen ist der Testumfang jedoch minimal, gleichwohl kann das eine erhebliche Wirkung auf Verbraucher und/oder Arbeitnehmer bedeuten.
- Reale Belastungsszenarien beinhalten häufig eine Mehrstoffexposition. Die so denkbar vielen Kombinationen können unmöglich umfassend in experimentellen Tests auf mögliche Wirkungen hin analysiert werden.

Vor diesem Hintergrund gibt es zunehmend Bemühungen, das Wissen zu Stoffen um Wirkmechanismen auf der biochemischen oder zellulären Ebene zu vertiefen und für die toxikologische Stoffbewertung nutzbar zu machen. Die dazu vorliegende Studie

- beschreibt die hierfür erforderliche Herangehensweise vom Mechanismus zum Effekt anhand von Beispielen zu biochemischen Prozessen und Fremdstoffeinwirkungen,
- erläutert, wie auf diese Weise Hypothesen zu bisher im Tierexperiment nicht beobachteten Wirkungen generiert und gezielt erforscht werden können,
- verdeutlicht dies für den Einzelstoff und für Stoffgemische,
- prüft die Eignung bereits bestehender Instrumente wie der (quantitativen) Struktur-Aktivitätsanalyse ((Q)SAR) zur Gewinnung von Erkenntnissen zum Wirkungsmechanismus von Fremdstoffen und
- berichtet von Ansätzen in der regulatorischen Toxikologie, die eben diese Verknüpfung der wirkungsbezogenen Testung mit der Erarbeitung mechanistischen Wissens zu Fremdstoffen im Auge haben.

### Biochemische und zelluläre Ereignisse und die Einwirkung von Fremdstoffen

Stoffwechselprozesse wie die Versorgung der Zelle mit Energie oder die Katalyse metabolischer Umsetzungen durch Enzyme, der Transport von Stoffen im extrazellulären Raum oder durch Membranen sowie eine regelkreisartige Kommunikation über

Signalketten gehören zu den grundlegenden Prozessen in einem Organismus. Einführend enthält diese Studie Beispiele für biochemische und zelluläre Ereignisse, die mit solchen Stoffwechselprozessen, Transportvorgängen oder der Signaltransduktion verbunden sind, und es wird beispielhaft anhand von einigen Fremdstoffen beschrieben, wie diese die genannten Funktionen stören können.

Die Bereitstellung von Energie erfolgt in Zellorganellen, den Mitochondrien, über die Zellatmung, in Form von energiereichem Adenosintriphosphat (ATP). Es gibt jedoch Fremdstoffe, die die Mitochondrienmembran durchdringen, Protonen abfangen und transportieren können und so die Zellatmung stören, d. h. die ATP-Synthese davon entkoppeln und dadurch eine Energiedepression herbeiführen. Zum Beispiel können 2,4-Dinitrophenol ebenso wie schwache organische Säuren oder andere saure Phenole diese chemische Entkopplung bewirken.

Ebenfalls mit der Energiebereitstellung der Zelle ist der zentrale Prozess des Citratzyklus verbunden. Dabei wird Citrat über das Enzym Aconitase zu Isocitrat umgewandelt. Die Substanz Fluorocitrat kann dieses Enzym hemmen, indem es einen Komplex mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms bildet, so dass der Citratzyklus zum Stillstand kommt. Fluorocitrat wird wiederum durch einen Fremdstoff „eingeschleppt“: das früher häufig verwendete Rodentizid Fluoracetat wird im Körper zu Fluorocitrat metabolisiert. Auf diese Weise kann es unter anderem zu Krampfanfällen und indirekt zu einer Ansäuerung des Bluts kommen.

Durch Umweltbelastung weit verbreitete Metalle wie Blei verhalten sich im menschlichen Organismus sehr ähnlich den physiologisch wichtigen Metall-Ionen Calcium oder Zink. So kann Blei Zink-Ionen im katalytischen Zentrum von Enzymen verdrängen. Dieser Prozess findet zum Beispiel in dem Enzym delta-Aminolävulinsäuredehydratase statt und kann indirekt zu einer durch Eisenmangel bedingten Anämie führen.

Nicht nur Stoffwechselprozesse können betroffen sein. Auch Transportvorgänge in der Zelle und im Organismus können durch Fremdstoffe gestört und geschädigt werden. Wie bereits beschrieben, hängt die Versorgung der Zelle mit Energie mit der Bereitstellung von ATP zusammen. Dieser Prozess erfordert einen Protonentransport durch die Membran der Mitochondrien. Als Transportweg gibt es dafür spezielle Kanäle. Die bekannten Organozinnverbindungen (sie werden zum Beispiel als Stabilisatoren in Kunststoffen eingesetzt) können diese Kanäle verschließen und so den Protonenfluss in das Innere des Mitochondriums unterbinden.

Einer der weiteren für essentielle Körperfunktionen erforderlichen Transportprozesse erfolgt über ein Glykoprotein, das die Aufgabe hat, Fremdstoffe aus den Zellen zu transportieren und der hepatischen (biliären) und renalen Exkretion zugänglich zu machen (Efflux-Transporter). Diese Transporter werden hauptsächlich in Geweben und Organen, welche eine Barriere zwischen „Außen“ und „Innen“ darstellen, exprimiert. Wird ein solches Protein mit wesentlichen Mengen von Fremdstoffen konfrontiert, kann es zu seiner Erschöpfung der Transportkapazität kommen. Künstliche Nitromoschusverbindungen und polyzyklische Moschusverbindungen besitzen eine hohe Affinität zu einem dieser Glykoproteine, dem P-Glykoprotein. So können diese zum Beispiel in Waschmitteln und Kosmetika vorhandenen Duftstoffe den Efflux-Transporter sättigen und zu einer Anreicherung von Substanzen in den Zellen beitragen.

Umweltchemikalien können nicht nur auf Stoffwechsel- und Transportprozesse Einfluss nehmen, sie können zum Beispiel auch die Kommunikation im Organismus beeinflussen, die über Signaltransduktion erfolgt. Extrazelluläre Signalmoleküle erreichen einen Rezeptor, wodurch z.B. eine Verstärkung der Signale veranlasst wird. Über weitere Signalübertragung wird eine zelluläre Reaktion erreicht. Es erfolgen Rückkopplungen nach Regelkreisprinzipien, die zur Beendigung der Reaktion führen.

Ein klassisches Beispiel für den Einfluss der Umwelt (Jodmangel, z.B. in der Nahrung) auf die Funktion von endokrinen Drüsen ist die thyroideale Dysfunktion. Wird die Schilddrüse nicht mit genügend Jod versorgt, findet die Hormonsynthese wegen des fehlenden Grundbausteins nicht regulär statt. Der hypothalamische-hypophysäre Regelkreis ist unterbrochen und führt z.B. zur Bildung eines Jodmangelstrumas.

Zahlreiche weitere Beispiele mit der Einwirkung von Fremdstoffen auf eines oder mehrere Stellglieder der Signaltransduktion lassen sich finden. So erfolgt die Anregung von Neurotransmittern im Gehirn über das Öffnen von Ionenkanälen, womit das Einströmen von Natriumionen in die Nervenzelle ermöglicht wird. Diese Aktivität wird im Bedarfsfall über ebenfalls einströmende Chlor-Ionen moduliert bzw. inhibiert. Das bekannte frühere Pflanzenschutzmittel Lindan (gamma-Hexachlorcyclohexan) verhindert das Einströmen dieser Chlor-Ionen durch Hemmung der Öffnung des entsprechenden Ionenkanals. Es kommt zur Dauererregung der betroffenen Nervenzellen, da keine negative Regulation mehr stattfindet.

Ähnlich wären weitere Prozesse zu benennen und deren mögliche Störung durch bestimmte Fremdstoffe. Wie berichtet, ist jedoch für die meisten Substanzen unbekannt oder im Detail nicht klar, über welchen Mechanismus sie auf den Organismus einwirken. Zusätzlich ist zu beachten:

- Stoffe wirken oft nicht nur über einen einzigen Mechanismus, sondern an mehreren Stellen auf unterschiedliche Prozesse. Diese Prozesse können miteinander verknüpft sein, so dass zunehmend komplexe Interaktionen auftreten.
- Aus der Erkenntnis einer prinzipiellen Einwirkung (qualitative Information) sind in der Regel noch keine Rückschlüsse auf die quantitative Einwirkung zu ziehen (reicht der Einfluss, um bei üblicher Aufnahmemenge des Stoffs zu einer Störung des physiologischen Ablaufs zu führen?)
- Extrapolationen auf ähnliche Stoffe sind nur mit erheblichen Einschränkungen möglich, weil zum Beispiel bereits sterische Veränderungen bei Isomeren gravierende qualitative und quantitative Folgen für die Interaktion mit biochemischen Prozessen im Organismus haben können.

Insofern stellen Erkenntnisse zum Wirkmechanismus zunächst fachlich gestützte Hypothesen dar, die durch gezielte Testungen zu überprüfen sind oder die Einfluss auf die Priorität von weiteren Untersuchungen haben können. In der Regel reichen die Erkenntnisse nicht aus, um gänzlich auf Tests zu verzichten.

### **Erkennung „neuer“ toxischer Endpunkte**

Einfach erkennbare Wirkungen werden in den teilweise endpunktbezogenen tierexperimentellen Tests, wie sie in den OECD-Richtlinien genauer charakterisiert sind, entdeckt. Es wurde deshalb im Rahmen dieses Projekts geprüft, ob mechanistische Erkenntnisse auf biochemischer oder zellulärer Ebene die Chance bieten, auch kom-

plexere oder weniger offensichtliche Wirkungen von Fremdstoffen aufzudecken. Wir beschreiben hierfür drei Beispiele:

1. Die Beteiligung von 2-Alkenalen bei neurodegenerativen Prozessen,
2. die Interaktion von Xenobiotika bei verzögerten allergischen Reaktionen, und
3. die mechanistischen Hintergründe für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltschadstoffen im Alter.

### 2-Alkenale und Neurodegeneration

Es ist bekannt, dass bestimmte Alkenale wie Propenal in Patienten mit Alzheimer-Erkrankung vermehrt im Gehirn auftreten. Diese Verbindungen können endogen dadurch entstehen, dass das Gehirn im Umgang mit den ubiquitär auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“, ROS) Alkenale bildet und diese im Gehirn im Laufe des Lebens akkumulieren. Die Verbindung 4-Hydroxy-2-Nonenal wird zum Beispiel auf diese Weise endogen gebildet. Ferner gibt es eine mechanistische Hypothese dazu, wie 2-Alkenale Nervenzellen zerstören könnten. Danach wird vermutet und durch experimentelle Untersuchungen gestützt, dass Alkenale die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) an Proteine nachahmen und eine ähnliche synaptische Signalübertragung auslösen. Wegen der Irreversibilität dieser Bindung werden Neuromodulationsvorgänge wie bei NO verhindert, was schließlich zum Verfall der Neuronen führt. Auch für das dem Propenal strukturähnliche Acrylamid wurde eine ähnliche Wirkung auf Neurotransmitteraktivitäten belegt. Grundsätzlich muss angenommen werden, dass auch andere Alkenale, die als Fremdstoffe aufgenommen wurden, in das Gehirn gelangen können, so dass sie verdächtigt werden, eine ähnliche Wirkung zu entfalten. Von besonderem Interesse könnten solche Stoffe sein, die zwar ursprünglich keine Alkenale sind, die jedoch enzymatisch zu diesen Verbindungen aufgespaltet werden können wie bestimmte Furanverbindungen. Aufgrund der geschilderten mechanistischen Zusammenhänge wird empfohlen, 2-Alkenale und Xenobiotika, die zu 2-Alkenalen metabolisieren, gezielt auf ihre mögliche neurodegenerative Wirkung zu testen.

### Xenobiotika und verzögerte allergische Reaktionen

Glucocorticoide sind Teil des immunregulatorischen Mechanismus. Sobald sie an den Glucocorticoid- (GC-)Rezeptor binden, wird die Immunreaktion gebremst. Der hier vorliegende Bericht konzentriert sich auf die Mechanismen, bei denen Xenobiotika die Funktion der GC-Rezeptoren und das Freisetzen von Zytokin Th1 stören. Glucocorticoide wie Dexamethason (DEX) besitzen einen aromatischen Ring, der für die Erkennung des GC-Rezeptors nötig ist, und sie besitzen ein agonistisches Reagens, das den Rezeptor „aktiviert“. Im Bereich der Pharmaforschung wurde erkannt, dass bestimmte (nicht-steroidale) Medikamente wie NSAID-1 mit vergleichbarer Struktur eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen. Eine verzögerte Allergie kann zellvermittelt über GC gesteuert sein, wenn das agonistische Reagens fehlt und der GC-Rezeptor durch eine Substanz nur blockiert wird (antagonistische Bindung an den GC-Rezeptor). Bei strukturell ähnlichen Fremdstoffen ist also zu befürchten, dass sie den Signalstrom zwischen den GC-Rezeptoren und dem Hypothalamus unterbrechen, was bewirkt, dass die Entzündungsreaktion des Körpers anhält, obwohl das Pathogen beseitigt wurde. Zum Beispiel wird bei dem Farbstoff Tartrazin eine Bindung an den GC-Rezeptor vermutet, da Tartrazin eine sehr ähnliche Struktur wie NSAID-1 aufweist, jedoch nicht den Rezeptor aktiviert, da das für erforderliche

agonistische Reagens fehlt. Es sind mehrere Studien dokumentiert, bei denen nach Tartrazinexposition allergische Reaktionen des hier beschriebenen Typs auftraten. Folglich wurden von uns einige Substanzen ermittelt, die dem Tartrazin ähnlich sind. Dazu zählen zum Beispiel vier Neonicotinoide, die als Insektizide eingesetzt werden. Es wird empfohlen, zu prüfen, ob die hier aufgeführten Substanzen auch in dieser Form ihr Ziel, z.B. Lungenepithelzellen, erreichen (Stabilitätsprüfung), sich dort hinreichend anreichern, und – sofern dies bejaht wird – ob sie eine ähnliche Interaktion mit dem GC-Rezeptor besitzen bzw. als Allergene wirken. Es handelt sich nach unserer Einschätzung auch deshalb um einen „neuen“ Endpunkt, als die Feststellung der hier zu betrachtenden Immunglobulin D (IgD-) Antikörperspiegel als möglicher Hinweis auf einen entsprechenden Allergietyp nicht zum regelmäßigen Untersuchungsprogramm von Chemikalien gehört.

### Empfindlichkeit gegenüber Umweltschadstoffen im Alter

Das endoplasmatische Retikulum (ER) hat eine wichtige Aufgabe bei der Faltung von Proteinen. Erfolgt diese nicht in korrekter Weise, können sich mit Akkumulation fehlgefalteter Proteine zelltoxische Effekte, z.B. im Gehirn, ergeben. Es wird vermutet, dass z.B. das Schwermetall Blei über seinen Einfluss auf die Kalziumhomöostase auf das endoplasmatische Retikulum einwirkt und auf dieser Weise zu alterstypischen Erkrankungen (wie Huntington'sche Krankheit, Alzheimer'sche Krankheit) beiträgt. Ein ähnlicher Mechanismus wird für verschiedene andere Substanzen anhand von Genexpressionsanalysen postuliert, z.B. für Nonylphenol, Di-(2-ethylhexyl)phthalat und Methoxychlor. Da beim gealterten Organismus ohnehin die Effektivität verschiedener spezifischer Schutzmechanismen (Bildung von Chaperonen im ER, die für die korrekte Faltung zuständig sind, Degradation fehlgefalteter Proteine über den so genannten „ERAD“- Mechanismus) deutlich beeinträchtigt ist, erscheint es plausibel, dass ein solcher fremdstoffbedingter Stress durch die genannten Substanzen am und im endoplasmatischen Retikulum ebenfalls zu diesen typischen Alterskrankheiten beiträgt. Über die mechanistischen Erkenntnisse wird die gezielte Überprüfung einer solchen Hypothese ermöglicht. Außerdem ergibt sich daraus der Verdacht für eine Kombinationswirkung (verstärkte Schädigung des endoplasmatischen Retikulums bei gemeinsamer Exposition gegenüber diesen Substanzen).

### **Kombinationswirkungen**

Wie angedeutet, ergeben sich mit den Erkenntnissen zum Wirkmechanismus des Einzelstoffs zugleich Anhaltspunkte dafür, dass bei gemeinsamer Exposition gegenüber weiteren ähnlichen Stoffen keine unabhängige Wirkung zu erwarten ist, sondern eine Kombinationswirkung, bei der sowohl Wirkungsverstärkung wie auch kompetitives Verhalten dieser ähnlichen Stoffe eine Rolle spielen kann. Diesem Aspekt sind wir nachgegangen

- durch die genauere Auswertung eines bereits bekannten Wirkungsmechanismus, nämlich der Wirkung von Stoffen über den Ah-Rezeptor und die Einordnung der Konsequenzen, wenn eine Exposition gegenüber mehreren Chemikalien, die über diesen Rezeptor wirken, besteht,
- durch eine mechanistische Diskussion, wie verschiedene Substanzen gemeinsam zu kardiovaskulären Effekten führen können, entweder aufgrund ihrer Ähn-

lichkeit oder aufgrund ihrer sich gegenseitig in der nachteiligen Wirkung ergänzenden Funktion,

- durch eine Auswertung von Literaturbeispielen, in denen a) mechanistische Vorstellungen zur Kombinationswirkung vorlagen, b) tatsächlich Stoffgemische getestet wurden und die kombinierte Wirkung mit der Einzelstoffwirkung verglichen wurde.

#### Gemische und Ah-Rezeptor vermittelte Effekte

Das bekannteste Beispiel, wo biochemisch-mechanistische Erkenntnisse für die Bewertung von Kombinationswirkungen regulatorisch bereits umgesetzt sind, sind die „Toxizitätsäquivalente“ bei Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen. Hier spielen Interaktionen von Fremdstoffen mit dem intrazellulären Ah-Rezeptor die zentrale Rolle („Aryl-Hydrocarbon“- oder Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor, Transkriptionsfaktor der inaktiv im Zytoplasma vorliegt und nach Aktivierung durch Xenobiotika in den Zellkern transloziert um dort die Transkription responsiver Gene zu stimulieren, diese Gene stehen in Zusammenhang mit Zellwachstum und Zelldifferenzierung, ein physiologischer Ligand des Rezeptors ist bis heute nicht bekannt). Es kann gezeigt werden, dass tatsächlich bei verschiedenen Gemischen von Tetrachlordibenzodioxin, Pentachlordibenzofuran und Polychloriertem Biphenyl 126 die Wirkungen sehr gut mit den Toxizitätsäquivalenten korrelieren. Eine genauere Analyse demonstriert aber auch, dass mit Gemischen aus Stoffen, die mit dem Ah-Rezeptor interagieren, Wirkungen auftreten können, die im Widerspruch zu einer einfachen linearen Korrelation stehen. Zum Beispiel

- können über die Wechselwirkung mit dem Ah-Rezeptor Metabolite gebildet werden, die den üblichen Ah-rezeptor-vermittelten Mechanismus inhibieren (wahrscheinlich durch Inhibition eines Cytochrom-Enzymabbaus oder durch Überexpression dieses Cytochroms),
- können unter den miteinander nah verwandten „polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen“ (PAK) gleichzeitig Rezeptoragonisten (wie Benzo(a)pyren) und Antagonisten (wie Fluoranthren) im Gemisch enthalten sein, so dass bei kombinierter Einwirkung bisher nicht genau quantifizierbare Folgen mit widersprüchlicher Wirkungsrichtung trotz gleichem Mechanismus zu berücksichtigen wären.

Diese Beispiele zeigen auch, dass die – grundsätzlich für sich korrekte – Beobachtung eines bestimmten Wirkmechanismus („interagiert mit Ah-Rezeptor“) nicht immer ausreicht, um quantitative Vorhersagen zur Wirkstärke bei kombinierter Einwirkung mit hinreichender Sicherheit treffen zu können.

#### Komplexe Gemische und kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen haben heute eine zentrale Stellung bei den Zivilisationskrankheiten, ohne dass diese Wirkung in Einzelstofftestungen im Tierexperiment abgebildet würde. Daher wird Umweltchemikalien möglicherweise nicht die Bedeutung zugemessen, die ihnen zukommen müsste. Andererseits wird z.B. in epidemiologischen Studien ein enger Zusammenhang zwischen kombinierter Staubbelastung, Dieselrußbelastung oder Tabakrauchexposition und kardiovaskulären Erkrankungen hergestellt. Dabei fehlt das mechanistische Verständnis oder es muss erweitert werden.

Eng verbunden mit kardiovaskulären Erkrankungen ist ein zu hoher Blutdruck, so dass Mechanismen, welche die Vasodilatation der Blutgefäße beeinträchtigen, eine Rolle spielen können. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Faktor bei der Signalleitung der Vasodilatation. Redoxreaktive Kohlenwasserstoffe in Dieselmotoremissionen können die Aktivität des NO synthetisierenden Enzyms inhibieren, so dass der NO-Spiegel und damit die vasodilatorische Aktivität gesenkt werden. Ferner besitzt das EDHF-System („endothelial-derived hyperpolarisation-factor“) eine zentrale Bedeutung bei der Vasodilatation. Im EDHF-System spielt unter anderem eine epoxidierte Fettsäure eine zentrale Rolle, deren Epoxidierung über CYP450 katalysiert wird. Störungen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Ah-rezeptor-aktive Substanzen führen nun aber zu Störungen bei der Aktivität der CYP450 Enzyme (z.B. geringere CYP-Induktion), was wiederum das EDHF-System beeinträchtigt und somit die gewünschte Gefäßerweiterung. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in Luftstaub, Zigarettenrauch und Dieselruß enthalten Ah-Rezeptor-aktive Substanzen und führen auch auf diese Weise zu Bluthochdruck. Unter anderem führen Dieselrußemissionen zu erhöhter ROS-Produktion mit entsprechender Auswirkung.

Diese reaktiven Sauerstoffspezies bewirken aber auch eine Oxidation des in der Blutbahn zirkulierenden „low-density lipoprotein“ (LDL), das von Bedeutung bei der Entstehung von Artherosklerose ist. Das oxidierte LDL (oxLDL) wird über einen bestimmten Rezeptor in die Zelle aufgenommen, der durch den vermehrten Anfall von oxLDL überexprimiert wird, was wiederum auch in der Zelle zu einem zusätzlichen ROS-Anstieg führt. Diese ROS-Produktion übersteigt die Entgiftungskapazität endogener Antioxidanzien und führt damit zu weiteren Schäden, u. a. zu Nekrose oder Apoptose in Zellen mit geschädigter DNA. Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) kann als Bestandteil des zellulären Reparaturmechanismus (der Basenexzisionsreparatur) bei übermäßiger DNA-Schädigung, z. B. nach kombiniertem Einwirken der genannten Substanzen, überfordert sein und den oben genannte Zelltod anstelle von Reparatur auslösen.

Dieser Sachverhalt ist deshalb von besonderem Interesse, weil nicht nur mechanistische Zusammenhänge durch Stoffgemische deutlich werden. Es wird ebenfalls erkennbar, dass die Interaktionen eine Komplexität erreichen, die exaktere quantitative Aussagen trotz eines verbesserten mechanistischen Verständnisses stark erschweren. In der Konsequenz ist z. B. bei Gemischen das oxidierende Potenzial ein hilfreicher Parameter für die Erfassung eines möglichen Einflusses auf kardiovaskuläre Erkrankungen, ferner sein Einfluss auf die NO-Produktion. Substanzen, die die Interaktion der PARP-1 mit der DNA behindern, müssen als besonders kritisch angesehen werden. Es scheint jedoch derzeit nicht möglich, auf dieser Basis eine quantitative Aussage zu den betrachteten Kombinationswirkungen zu machen.

#### Literaturbeispiele mit getesteten Stoffkombinationen und gemeinsamem Wirkmechanismus

Die Pestizide Fenarimol, Vinclozolin und Acephat sind weit verbreitete Pestizide, die als Einzelstoffe bewertet sind. Alle drei Substanzen sind Substrate für Enzyme der P450-Enzymfamilie und induzieren gleichermaßen CYP. Dies hat zur Folge, dass auch CYP-abhängige Enzyme vermehrt oder vermindert exprimiert werden können. Beispielsweise führen die genannten Pestizide zur vermehrten Hydroxylierung von Testosteron in der (Mäuse-)leber, was an der erhöhten Testosteron-Hydroxylaseaktivität abgelesen werden kann. Eine Studie prüfte, in welcher Weise bestimmte

Gemische der genannten Pestizide zur CYP-Induktion einerseits, zur NADPH-Reduktase Aktivität andererseits und zu weiteren verschiedenen CYP-abhängigen Enzymaktivitätsveränderungen führen. Die Ergebnisse ergeben kein klares Bild und erlauben es nicht, eine antagonistische, synergistische oder additive Wirkung der Substanzen im Gemisch vorauszusagen. Das Beispiel verdeutlicht, wie möglicherweise fragwürdig die Aussagen von Einzelstofftestungen für das Zusammenwirken von Gemischen und wie unsicher die Übertragung einer Vorhersage von einem Gemisch auf andere Gemische sein kann.

Eine andere Studie untersuchte die Effekte verschiedener Weichmacher (Phthalate und Adipate) sowie strukturell verwandter substituierter Phenole, welche als Komponenten von Kunststoffen oder als Zusatzstoffe in Kunststoffen vorkommen. Weiterhin wurden noch phenolische Komponenten von Herbiziden getestet. Die gemeinsame östrogene Wirkung und Beeinflussung der Schilddrüsenhormonregulation wurden näher betrachtet:

Simultane Exposition unterhalb der Effektschwelle (NOAEC) der Einzelverbindungen führte noch nicht zu einer Rezeptoraktivierung. Allerdings kam es bei gleichzeitiger Exposition gegenüber den individuellen Effektkonzentrationen (LOAEC) zu einer Wirkungsverstärkung. Die Abweichung gegenüber der Additivität war gering. Die einfache Erkenntnis, dass der Östrogenrezeptor am Wirkungsmechanismus beteiligt ist, ergibt jedoch noch keine hinreichende Eingrenzung der Art der Wirkungsbeeinflussung durch mehrere Komponenten.

Im Kombinationswirkungs-Experiment mit Blick auf die Schilddrüsenhormonregulation war die Wirkung des Gemischs bei den NOAEC der Einzelsubstanzen gleich der der Einzelkomponenten. Bei den LOAEC war ein stimulierender Effekt auf die Proliferation zu beobachten, jedoch war der Wert geringer als die maximalen Werte der wirksamsten Einzelsubstanzen. Die Wirkungen des Gemischs waren untradditiv. Die komplexen Einflüsse auf das (Triiodthyronin-) T3-induzierte Zellwachstum zeigen die Schwierigkeit einer verallgemeinerbaren Vorhersage von Wirkungen komplexer Gemische, auch wenn mechanistische Elemente in die Analyse einbezogen werden.

### **Struktur-Wirkungsanalyse zur Erkennung „neuer“ toxischer Endpunkte**

Bereits zum jetzigen Zeitpunkt wird versucht, tierexperimentelle Testungen zu vermeiden. Dafür kommen eventuell Struktur-Wirkungsanalysen (SAR) und Quantitative Struktur-Eigenschafts-/Wirkungs-Beziehungen (QSPR/QSAR) in Betracht. Nicht immer basiert die entsprechende „in silico“-Methode auf einem mechanistischen Hintergrund. Es wurde geprüft, inwieweit mechanistische Überlegungen in (Q)SAR-Modelle eingehen und es wurde versucht, QSAR-Modelle auf die oben charakterisierten „neuen“ Endpunkte und die hier diskutierten Beispielsstoffe anzuwenden.

#### Mechanistische Überlegungen bei der (Quantitativen) Struktur-Wirkungsanalyse

In der (Quantitativen) Struktur-Wirkungsanalyse werden grundsätzlich zwei Herangehensweisen unterschieden, zum einen sogenannte

- regelbasierte Systeme, und zum anderen
- statistische Verfahren.

Bei regelbasierten Systemen werden empirische Regeln, die von Experten aufgestellt bzw. geprüft wurden, mittels Computern systematisiert und angewendet, um die Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Eigenschaften vorherzusagen. Wesentliche Basis dafür ist das Vorhandensein oder die Abwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen in einem Molekül, von denen bekannt ist, dass sie z.B. für eine bestimmte Wirkung verantwortlich sind. Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass es i.d.R. Vorstellungen zum Mechanismus der Wirkung gibt. Nachteil ist, dass der Erfahrungsraum nicht mit Hilfe des Expertensystems erweitert werden kann, da die Prädikation ja auf bereits bekannten Regeln beruht, also eine bestimmte Breite der Datenbasis benötigt.

Im Fall der statistischen Herangehensweise ist es zwar ebenfalls erwünscht, eine mechanistische Basis zu haben (s. Validitätskriterien der OECD für QSAR) – dies ist aber nicht immer gegeben. Vielmehr werden nach unterschiedlichen statistischen Methoden Wirkungen und Strukturelemente eines chemischen Moleküls korreliert. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass aus dem System heraus kein Wirkmechanismus abgeleitet werden kann, sondern weiteres Expertenwissen notwendig ist. Ein Vorteil ist jedoch, dass durch Induktion neue Hypothesen über molekulare Eigenschaften erstellt werden, wie z.B. die Bioverfügbarkeit oder die Fähigkeit einer Substanz, die Funktion eines bestimmten Proteins im Organismus zu hemmen oder zu verstärken („Erweiterung des Erkenntnisraums“). Für alle Herangehensweisen ist jedoch zentral, dass davon ausgegangen wird, dass i.a. ähnliche Moleküle (oder zumindest ähnliche molekulare Teilstrukturen) zu ähnlichen Wirkungen führen und dass es eine gewisse experimentelle Datenbasis geben muss, um aussagekräftige und verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

#### Anwendung auf Erkenntnisse zu „neuen“ Endpunkten

Für die oben dargestellten Beispiele (2-Alkenale und Neurodegeneration; potenzielle Glucocorticoid-Antagonisten mit allergener Wirkung) wurden ebenfalls QSAR-Modelle eingesetzt, um zu prüfen, ob diese Modelle eine Vorhersage zum vermuteten Effekt bieten könnten. Für die Neurodegeneration und verzögerte allergische Reaktion sind jedoch keine QSAR-Modelle verfügbar und damit keine entsprechenden Prädikationen möglich. Auch die breiter definierten Endpunkte (Neurotoxizität und Immuntoxizität als Annäherung) sind meist (noch) nicht durch QSAR-Modelle zugänglich. Ein Grund hierfür ist sicher das Fehlen einer ausreichenden Menge experimenteller Daten ausreichender Qualität mit ein und derselben experimentellen Konfiguration. Dies ist auch die derzeit entscheidende Hürde für die Erarbeitung von Modellen, die eine Prädikation des Einflusses von Chemikalien auf biochemische Parameter erlauben würden. Es liegen demnach derzeit weder hinreichende substanzspezifische experimentelle Tests vor, um die postulierten Wirkungen überprüfen zu können, noch kann mit Hilfe von QSAR-Prädikationen die Relevanz von Chemikalien bzgl. der hier betrachteten Wirkungen überprüft werden. Somit kann die auf mechanistischen Überlegungen beruhende Hypothese nicht durch QSAR abgesichert werden, obwohl gute QSAR-Modelle auch eine mechanistische Hypothese unterstützen können oder zur guten Dateninterpretation eine solche erfordern (eine mechanistische Hypothese ist die Grundlage für die Auswahl der zur Modellbildung herangezogenen experimentellen Daten). Eine Verwendung im Rahmen der regulatorischen Toxikologie (wie dies ähnlich z.B. bei der Optimierung von Arzneimittelwirkstoffen erfolgte) wäre jedoch ein wesentlicher Treiber für die Entwicklung von QSAR-Modellen. Für die Prädikation von Immuntoxizität und (verzögerte) allergische Reaktionen be-

finden sich einige Module in der Entwicklung, ebenso für die „Passage der Blut-Hirn-Schranke“. Damit sind für die nähere Zukunft vom Grundsatz her Prädikationsmöglichkeiten zumindest für diese („Ersatz-“) Endpunkte zu erwarten.

## **Mechanistische Ansätze in der regulatorischen Toxikologie, Stand, Forschungsaktivitäten und weitere Ansätze**

### Derzeitige Bedeutung in der regulatorischen Toxikologie

Die meisten derzeit vorliegenden OECD-Tests zur Charakterisierung der toxikologischen Eigenschaften einer Substanz sind endpunktorientiert und belassen den Mechanismus als „black box“. Die Anforderungen nach der europäischen Chemikaliengesetzgebung (REACH) sind in der Mehrzahl über Wirkungstests abzudecken. Es gibt jedoch zu einzelnen Endpunkten auch mechanismusorientierte Tests: ein Beispiel ist der lokale Lymphknotentest an der Maus (local lymph node assay, LLNA, OECD TG 429).

Auf anderen Gebieten gibt es jedoch bereits regulatorisch anerkannte und standardisierte *in vitro* Ersatzmethoden zum Tierversuch, die einen mechanistischen Hintergrund nutzen. So zum Beispiel im Bereich der Phototoxizität (z.B. 3T3 NRU Test, OECD TG 432). Durch Einsatz ganzer Testbatterien (Kombination verschiedener Tests) kann die fehlende Genotoxizität einer Substanz ausreichend sicher behauptet werden, ohne tierexperimentelle Untersuchungen durchzuführen. Die dafür eingesetzten *in vitro* Tests geben jeweils auch Hinweise auf den Mechanismus der Genotoxizität.

Innerhalb der Europäischen Union werden die Anstrengungen zur Vermeidung von Tierversuchen und zur Standardisierung angewandter Methoden mit dem Fokus zur regulatorischen Anwendbarkeit in der Chemikalienprüfung, in einer Datenbank am „Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)“ des „Joint Research Centre“ (JRC) gesammelt. Von Seiten der Gesetzgebung wird gefordert, solche alternativen, mechanistischen Ansätze zu suchen und anzuwenden (siehe REACH). Dies wird innerhalb der Forschung in zunehmendem Maß umgesetzt. Die weitere Entwicklung mechanistisch basierter, schnell durchzuführender Testbatterien wird nötig sein, um den regulatorischen Anforderungen gerecht zu werden.

*In vitro* Versuche werden im Moment häufig zu „screening“ Zwecken benutzt. Immer häufiger werden diese Verfahren jedoch auch eingesetzt, um die Wirkmechanismen aufzuklären oder besser zu verstehen. Sie reichen in den meisten Fällen nicht aus, um den Tierversuch zu ersetzen. Der Großteil dieser Tests ist noch nicht validiert und ihr regulatorischer Stellenwert somit nicht festgelegt.

### Vergleichende toxikogenomische Datenbank

Die „Comparative Toxicogenomics Database“ (CTD) stellt ein Werkzeug dar, mit dem beispielsweise Gene identifiziert werden können, die eine Wechselwirkung mit einer bestimmten Chemikalie eingehen. Ferner werden die mit einer solchen Wechselwirkung assoziierten Krankheiten, also ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Chemikalie und einer Krankheit ausgewiesen. Als Datengrundlage dienen in der Literaturdatenbank PubMed aufgenommene Zeitschriftenartikel. Zudem werden für Beziehungen zwischen einem Gen und einer Krankheit die NLM-Datenbank OMIM („Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>“) und für Informationen zum

Signaltransduktionsweg („Pathways“) das KEGG-System („Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“) herangezogen.

Die Datenbank wird monatlich aktualisiert und enthält zurzeit (Stand: Oktober 2009) beispielsweise etwa:

- 195.000 Beziehungen zwischen Chemikalien und Krankheiten
- 190.000 Wechselwirkungen zwischen Chemikalien und Genen
- 670.000 Beziehungen zwischen Genen und Krankheiten.

Einer der großen Vorteile der CTD besteht darin, dass ein großer Aufwand bei der Datenaufbereitung betrieben wurde, beispielsweise um das verwendete Vokabular zu vereinheitlichen und (hierarchisch) zu organisieren.

Die Datenbank bietet eine Fülle von verschiedenen Suchoptionen und Werkzeugen und die Ergebnisse beinhalten vielfältige Verknüpfungen (bis hin zu dem zugrunde liegenden PubMed-Eintrag). Prinzipiell bietet CTD die Möglichkeit, über die verschiedenen Beziehungen Hinweise auf mögliche durch Chemikalien vermittelte Krankheiten zu erhalten und ist in dieser Form sicher einzigartig. Allein durch die Eingabe des Chemikaliennamens erhält man eine Liste möglicher, mit dieser Chemikalie assoziierter Krankheiten.

Die gelieferten Hinweise sind aber oftmals indirekter Natur und die zugrunde liegenden Daten sind im Detail kritisch zu prüfen, können jedoch als Hinweise für weitere Recherchen dienen. CTD ist nur eine, wenn auch die für toxikologische Fragestellungen bedeutendste Datenbank mit toxikogenomischen Informationen.

### Das Konzept der U.S. EPA

Im Jahr 2007 wurde von einer Expertenkommission der U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) und des U. S. National Institute of Environmental Health Services (US NIEHS) am National Research Council (NRC) eine grundlegende Schrift herausgegeben: „Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy“. Die Veröffentlichung stellt ein zentrales Dokument in der derzeitigen regulatorischen Toxikologie dar. Ausgangspunkt der Überlegungen des NRC und der EPA ist eine Schwachstellenanalyse am derzeitigen Vorgehen der toxikologischen Risikobewertung. Die Einschränkungen, wie sie die eigens eingesetzte Expertenrunde beim momentanen Vorgehen in der Prüfung der Toxizität von Chemikalien sieht, sind:

- die grundsätzliche Unsicherheit bei Verwendung tierexperimenteller Daten,
- die Extrapolation von einer Hochdosis (tierexperimentelle Studie mit kleinen Tierzahlen) auf eine niedrigere humanrelevante Dosis,
- erforderliche aufwändige Entwicklung immer weiterer zusätzlicher endpunktbezogener Tests, weil relevante Endpunkte im bisherigen Prüfsystem unzureichend abgedeckt waren und entsprechende Erfordernis zur Nachtestung von Substanzen,
- das ethische Problem des Tierschutzes,
- die Ausweitung des letztgenannten Problems angesichts der geforderten umfangreicheren Testung zusätzlicher toxikologischer Endpunkte für weitere Stoffe (zentrale Thematik bei REACH),

- die damit verbundenen extremen Kosten,
- die unzureichende Möglichkeit der Charakterisierung von Gemischen,
- unzureichende Zuordnung zu Risikogruppen oder Lebensphasen.

Vor diesem Hintergrund wird die derzeitige Teststrategie als Sackgasse angesehen und ein „grundlegend neues“ Konzept vorgeschlagen. Das neue Konzept des NRC stellt einen „bottom up“-Ansatz dar. Daten zu physikochemischen und biochemischen Parametern sollen ermittelt und genutzt werden, um die Toxizität eines Stoffes im Menschen festzustellen oder vorauszusagen, wobei in selteneren Fällen eine Absicherung über tierexperimentelle Studien notwendig ist und diese dann ggf. gezielt eingesetzt werden können.

Zur Verwirklichung eines solchen Konzepts ist es unabdingbar, dass zahlreiche stoffspezifische Daten, die uns Auskunft über die Interaktion von Stoffen mit dem Organismus geben, z.B. über *in vitro* Systeme erhoben werden. Hierfür stehen inzwischen moderne aufwändige Techniken bereit (z.B. Genomics, Proteomics, Metabonomics). Dazu sollen anhand von bereits vorhandenen Daten und computerbasierten Modellen Vorhersagen zu den Eigenschaften und der Toxizität getroffen werden. Zu diesem Zweck hat die EPA das Informationsnetzwerk ACToR („Aggregated Computational Toxicology Resource“) geschaffen. In Verbindung mit ACToR ist das prädiktive Programm ToxCast™ der EPA zu sehen: In einer ersten Stufe dieses Programms, wurde bereits für über 300 Chemikalien, deren toxikologisches Verhalten aus *in vivo* Untersuchungen bekannt ist, ein toxikologisches Profil erstellt und in dieser Datenbank hinterlegt (Validierungssatz). Für diese Substanzen wurde auch mit Hilfe von *in vitro* und *in silico* Methoden die Toxizität abgeschätzt. Auch die oben bereits diskutierte „Comparative Toxicogenomics Database“ CTD ist in ACToR integriert.

Ausgehend von diesen Aktivitätsprofilen wurde versucht, ein Muster für die Vorhersage von Toxizität im *in vivo* Versuch zu generieren. In der zweiten Phase soll die Vorhersagekraft noch gesteigert werden und eine vielfältigere Auswahl an Chemikalien getestet werden. In der dritten und gleichzeitig wichtigsten Phase soll nun das Wissen, welches in Phase eins und zwei angesammelt wurde, dazu benutzt werden, um Prioritäten für die zur Prüfung ausstehenden Chemikalien zu setzen.

Recherchen in ToxCast wie in ACToR benötigen eine harmonisierte Sprache und konventionalisierte Eingabe der chemischen Struktur. Das System hierfür wird über das DSSTox Projekt geliefert („Distributed Structure-Searchable Toxicity Database Network“).

Die konsequente methodische Nutzung neueren Wissens in einem integrierten Ansatz ist etwas grundlegend Neues. Die einzelnen Elemente aber, z.B. die Ergründung der Toxizität über mechanistische Studien, die Nutzung von Genomics, die Einbeziehung von QSAR-Elementen etc. ist im Prinzip ein seit längerer Zeit zunehmend verfolgter Ansatz, der in Einzelfällen bereits in den letzten 10 Jahren Anwendung fand.

## Schlussfolgerungen

Die Ausführungen haben gezeigt, dass das Umweltbundesamt mit diesem Projekt zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine hochaktuelle Thematik in der Konzeption toxikolo-

gischer Testungen und in deren Einbettung in die regulatorische Toxikologie aufgreift. Nur wenig früher hatten in den USA ähnliche Diskussionen begonnen, die erst in jüngster Zeit zu ersten (vorläufigen) Ergebnissen führen. Mit dem Konzept der „Toxikologie des 21. Jahrhunderts, eine Vision und eine Strategie“ wird eben diese Thematik in den USA derzeit intensiv verfolgt. Allerdings wird mit dem Hinweis der amerikanischen Behörden auf den Visionscharakter auch deutlich, dass wir uns mit einer toxikologischen Betrachtungsweise, die von (mechanistisch begründeten) Toxizitätspfaden ausgeht, noch am Anfang befinden und zunächst eine Strategie entwickeln müssen, um diese Vision zur Wirklichkeit werden zu lassen.

Durch den Blick auf neue Endpunkte und Gemische wird demnach beim Umweltbundesamt ein Teilaspekt dieses Paradigmenwechsels in der regulatorischen Toxikologie aufgegriffen, der besonders ambitioniert ist und im besonderen Maße noch Visionscharakter besitzt. Die Komplexität, die mechanistische Unsicherheit und die begrenzte Datenlage zu den „neuen“ Endpunkten (wie Alzheimer Erkrankung, spezifischer immuntoxischer Mechanismen oder des Alterns) verhindern noch, dass Hypothesen mit genügender Sicherheit aufgestellt und umfassend validiert werden können. Anhand der Betrachtungen zu Gemischen wurde gezeigt, dass auch in diesem Bereich bei vielen konkurrierenden und miteinander verzahnten mechanistischen Schritten es derzeit noch schwer ist, den für die resultierende Gesamtwirkung maßgeblichen Toxizitätspfad zu erkennen und (zumindest halb-) quantitative Schlussfolgerungen zu ziehen.

Dennoch erscheint es uns unabdingbar, die hier angestellten Betrachtungen fortzuführen und auch die Wirkung von Chemikalien in Richtung auf bisher wenig betrachtete „neue“ Endpunkte zu lenken sowie Methoden zu entwickeln, die bei heterogenen Gemischen mit komplexer Stoffzusammensetzung qualifizierte Antworten zur Schädigung ermöglichen. In diesem Sinne würden wir es begrüßen, wenn

- die oben genannten Furanverbindungen näher untersucht würden, in ihrem Metabolismus (Bildung von 2-Alkenalen), in ihrer Möglichkeit, die Zielzellen zu erreichen (Überwindung der Blut-Hirnschranke), und in ihrer Fähigkeit, als Substituent von Stickstoffmonoxiden Neurotransmittertransport zu stören,
- die im Zusammenhang mit verzögerter Immuntoxizität genannten Verbindungen (Fibronil, Neonicotinoide) näher untersucht würden, ob sie den Glucocorticoid-Rezeptor erreichen, zu einer entsprechenden Interaktion mit dem Rezeptor führen und ob sie in der Lipid-Wasser-Grenzschicht akkumulieren,
- die im Zusammenhang mit den Auswirkungen des Alterns genannten Verbindungen bzw. Stoffgruppen (Phthalate, Nonylphenol und Methoxychlor) näher auf ihre neurotoxische Wirkung und den dafür maßgeblichen Mechanismus untersucht würden, wobei zunächst die Datengrundlage (Zitate nach der Comparative Toxicogenomic Database CTD) im Original zu analysieren und auf ihre Aussagekraft hin zu bewerten wären.

Auch wenn sich einige der aufgestellten Hypothesen zur Wirkungsähnlichkeit der betrachteten Substanzen – wie zu erwarten – nicht bestätigen werden, sind die Beispiele hilfreich, um wirkungsorientierte Ansätze entsprechend zu erweitern und um ggf. erforderliche weitere Nebenbedingungen angemessener einbeziehen zu können.

Zu Gemischen mit einer geringeren Anzahl von interagierenden Stoffen wäre es hilfreich, mit Hilfe der CTD gemeinsam betroffene Endpunkte und/oder gemeinsam be-

troffene Veränderungen in der Gen- oder Proteinexpression zu erfassen und für das konkrete Gemisch solche postulierten Veränderungen in der Gen- oder Proteinexpression experimentell zu überprüfen und Wirkungstests auf begründet vermutete, besonders bedeutende Wirkungsendpunkte durchzuführen.

Weitergehend sind folgende Vorschläge zur Umsetzung zu machen:

- Sofern Risikoabschätzungen zu Einzelstoffen vom Umweltbundesamt veranlasst werden, könnte vom Auftragnehmer grundsätzlich gefordert werden, dass Erkenntnisse zu Wirkungsmechanismen als Element des Stoffberichts vermehrt dokumentiert und berücksichtigt werden. Zwar enthalten auch derzeitige Risk Assessment-Monographien oft eine Passage, in der der „Mode of Action“ benannt für den als zentral erachteten Effekt wird, auf die Informationen, wie sie zum Beispiel in „-Omics“-Analysen generiert werden und wie sie zum Beispiel in der CTD hinterlegt sind, wird dabei jedoch in der Regel verzichtet. Diese Überlegung kann auch bei Endpunkten, die zunächst nicht als kritisch bewertet werden, von Interesse sein, ganz im Sinne der im vorliegenden Bericht thematisierten „neuen“ Endpunkte.
- In diesem Sinne sollten bei Stoffbewertungen bei Endpunkten, wo die derzeitige Datenlage keine abschließende Bewertung erlaubt, auch Überlegungen aus kristallographischen Methoden in Verbindung mit Toxizitätspfaden in READ-ACROSS-Abschätzungen eingehen, selbst wenn der zeitige (Q)SAR-Modelle den betreffenden Endpunkt noch nicht abdecken.
- Für endpunktbezogene Forschung stehen zum Teil bereits geeignete High-Throughput-Screening- (HTS-) Methoden zur Verfügung, die genutzt werden sollten, um auf dieser Basis gezielt prioritäre Einzelstoffe für spezifischere Testungen zu generieren und um Daten einzupflegen, die anderen Nutzern im internationalen Raum eine verbesserte Datenbasis bieten. So gibt es für den Endpunkt der Entwicklungsneurotoxizität entscheidende Fortschritte, die Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Ein umfassender Überblick über die konkrete Eignung und Validierung der vorliegenden HTS-Methoden oder anderer biochemisch-mechanistischen Ansätze zur Erkennung von Toxizitätspfaden (z.B. auch der *in vitro*-Methoden nach EC50) sowie der entsprechenden Datenbanken liegt bisher nicht vor und wurde auch im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht generiert. Eine wichtige Basis zur verbesserten Nutzung dieses Instrumentariums wäre also eine qualifizierte Dokumentation wünschenswert, die unter anderem wirkungsendpunktbezogene Analysen ermöglicht (wie zum oben genannten Beispiel der Entwicklungsneurotoxizität). Eine solche Dokumentation sollte laufend aktualisiert und ergänzt werden können.
- Mit dem umfangreicheren Wissen um Toxizitätspfade ergibt sich eine Problematik für die bisherige Methodik einer Risiko- und Grenzwertabschätzung von chemischen Stoffen und Gemischen. Ein zentraler Eckpunkt derzeitiger Bewertungen ist der „No adverse effect level“ (NOAEL) oder die entsprechende Effektkonzentration (LOAEL). Es wäre nach unserer Einschätzung eine wichtige Aufgabe regulatorischer Planung, in Anbetracht von biochemischen oder zellulären Veränderungen und Störungen weit unterhalb des von außen beobachtbaren adversen Effekts eine neue Taxonomie des Adversitätsbegriffs zu initiieren.

## Summary

### Subject of the research project

The new European chemicals legislation requires the systematic study of marketed chemicals for properties of relevance to health. Animal studies that describe adverse effects on health (or their absence) are mainly used for this purpose, although the underlying mode of action does not necessarily have to be known. However, carrying out specific animal studies is difficult to reconcile with the principles of animal protection and may involve extreme financial expenditure. Moreover, their validity is limited and inevitably involves substantial gaps:

- The animal model is not always suited to detect all xenobiotic-related health effects on humans (in qualitative and quantitative terms).
- Currently, comprehensive tests are generally only required if a large tonnage is placed on the market. In the case of small amounts, however, the scope of testing is minimal although a considerable effect on consumers and/or workers may be involved.
- Real exposure scenarios often imply exposure to several substances. Experimental tests cannot comprehensively analyse possible effects for the resulting wide range of conceivable combinations.

Against this background, efforts are increasingly being made to gain more information about the modes of action of substances on a biochemical or cellular level and to use these data for toxicological substance assessments. The present study

- describes the approach necessary for this, from mechanism to effect, using examples of biochemical processes and the impacts of xenobiotics,
- explains how hypotheses of effects that have up to now not been observed in animal studies can be generated and investigated specifically,
- illustrates this for individual substances and for mixtures of substances,
- examines the suitability of already existing instruments such as the (quantitative) structure-activity relationship ((Q)SAR) to obtain information on the mode of action of xenobiotics, and
- reports on approaches in regulatory toxicology that specifically aim at linking effect-related testing to establishing mechanistic information on xenobiotics.

### Biochemical and cellular events and the impact of xenobiotics

Metabolic processes, such as the supply of cells with energy, the catalysis of metabolic transformation by enzymes, the transport of substances into the extracellular space or through membranes and communication based on a feedback control system via signalling chains, are fundamental processes in an organism. As an introduction, this study gives examples of biochemical and cellular events that are associated with such metabolic processes, transport procedures or signal transduction, and describes, again by way of example, how some xenobiotics can possibly interfere with the functions mentioned.

Energy is supplied by cell organelles, the mitochondria, via cellular respiration in the form of high-energy adenosine triphosphate (ATP). However, there are xenobiotics that can penetrate the mitochondrial membrane, trap and transport protons and thereby disturb cellular respiration, *i.e.* uncouple ATP synthesis from it, thus leading to energy depletion. For example, 2,4-dinitrophenol and weak organic acids or other acidic phenols are able to induce this chemical uncoupling.

The key process of the citric acid cycle is also associated with cellular energy supply. Citrate is converted to isocitrate by the enzyme aconitase. The substance fluorocitrate is able to inhibit this enzyme by forming a complex with the catalytic centre of the enzyme, thus stopping the citric acid cycle. Fluorocitrate in turn is "entrained" by a xenobiotic: Fluoroacetate, which was often used in the past as a rodenticide, is metabolised to fluorocitrate in the body. This may induce convulsions and indirectly lead to an acidification of the blood.

In the human organism, metals that are widespread due to environmental pollution such as lead behave very similarly to the physiologically important metal ions calcium or zinc. Thus, lead is able to displace zinc ions in the catalytic centre of enzymes. As an example, this process takes place in the enzyme delta-aminolaevulinic acid dehydratase and may indirectly lead to anaemia caused by iron deficiency.

Xenobiotics may not only affect metabolic processes, but also disturb and damage transport processes in the cell and organism. As described before, the energy supply of the cell is associated with the provision of ATP. For this process, protons must be transported through the mitochondrial membrane. Specific channels function as transport mechanisms. The well-known organotins (they are used as stabilisers in plastics for example) can obstruct these channels and thus stop the flow of protons into the mitochondria.

Another transport process necessary for essential bodily functions occurs via a glycoprotein, which transports xenobiotics from the cells and makes them accessible to hepatic (biliary) and renal excretion (efflux transporter). These transporters are mainly expressed in tissues and organs that form a barrier between "outside" and "inside". If such a protein is confronted with considerable amounts of xenobiotics, its transport capacity may be depleted. Artificial nitromusk compounds and polycyclic musk compounds have a high affinity to one of these glycoproteins, the P-glycoprotein. These fragrances, which are for example present in detergents and cosmetics, may saturate the efflux transporter and contribute to an accumulation of substances in the cells.

Environmental chemicals may not only have an impact on metabolic and transport systems, but may also influence those communication processes in the organism that take place via signal transduction. Extracellular signal molecules reach a receptor, which induces an amplification of the signals for example. A cellular reaction results from further signal transduction. Based on the principles of a feedback control system, feedback will then terminate the reaction.

Thyroidal dysfunction is a classical example of the impact that environment (iodine deficiency, *e.g.* in the diet) may have on the function of endocrine glands. If the thyroid is not supplied with enough iodine, hormone synthesis does not regularly take place due to a lack of its basic component. The hypothalamic-pituitary feedback system is disrupted and may lead to the development of an iodine deficiency struma.

There are numerous other examples of the impact of xenobiotics on one or several control elements of signal transduction. Thus, neurotransmitters in the brain are stimulated via the opening of ion channels, enabling the flow of sodium ions into the nerve cell. If required, this activity is modulated or inhibited via a concurrent influx of chlorine ions. The well-known former plant protection product lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) prevents the influx of these chlorine ions by inhibiting the opening of the relevant ion channel. Permanent stimulation of affected nerve cell results in the absence of negative regulation.

Further processes and their possible disturbance by certain xenobiotics may similarly be mentioned. However, as reported, the mechanism via which substances act on the organism is not known or clear in detail for most of them. In addition, the following must be borne in mind:

- Substances not only act via a single mechanism, but on different processes at several sites. Since these processes may be linked with each other, increasingly complex interactions may occur.
- As a rule, no conclusions as to the quantitative effect can be drawn from the finding of a general effect (qualitative information) (is there enough impact for a disturbance of the physiological process to be induced if the usual amount of substance is absorbed?).
- Extrapolations to similar substances are possible only with considerable restrictions because steric changes in isomers for example may even have major qualitative and quantitative consequences for an interaction with biochemical processes in the organism.

Therefore, data on the mode of action are initially hypotheses supported by knowledge that must be verified by specific testing or may influence the priority of further investigations. The findings are generally not sufficient to dispense with tests completely.

### **Identification of “new” toxic end points**

Animal testing, as characterised in detail in the OECD guidelines, usually just looks at apical end points and may readily detect clear-cut adverse effects. Therefore, the aim of this project was to investigate whether mechanistic findings on a biochemical or cellular level would make it possible to provide evidence of even more complex or less obvious effects of xenobiotics. We describe three examples of this:

4. Involvement of type-2 alkenes in neurodegenerative processes,
5. Interaction of xenobiotics in delayed hypersensitivity reactions, and
6. Mechanistic backgrounds for an increased sensitivity to environmental pollutants in ageing.

#### Type-2 alkenes and neurodegeneration

It is known that an increased incidence of certain type-2 alkenes like propenal is found in the brain of patients with Alzheimer's disease. These compounds may develop endogenously when the brain forms alkenes in contact with the ubiquitously occurring reactive oxygen species (ROS). These accumulate in the brain in the

course of one's life. The compound 4-hydroxy-2-nonenal, for example, is formed endogenously in this way. Moreover, there is a mechanistic hypothesis on how type-2 alkenes might destroy nerve cells. It is assumed and supported by experimental studies that type-2 alkenes mimic the binding of nitrogen monoxide (NO) to proteins and produce similar synaptic signal transduction. Since this binding is irreversible, neuromodulation processes as seen with NO are inhibited. This finally leads to neuron decay. A similar effect on neurotransmitter activities has been substantiated for acrylamide, which is structurally related to propenal. It must generally be assumed that other alkenes that were absorbed as xenobiotics may also reach the brain. Therefore, they are suspected of having a similar effect. Substances that are not originally alkenes but can enzymatically be broken down into these compounds, such as certain furan compounds, might be of special interest. On the basis of the described mechanistic relationships, it is recommended that type-2 alkenes and xenobiotics that metabolise into type-2 alkenes are specifically tested for their possible neurodegenerative effect.

#### Xenobiotics and delayed hypersensitivity reactions

Glucocorticoids are part of the immunoregulatory mechanism. As soon as they bind to the glucocorticoid (GC) receptor, the immunoreaction is inhibited. This report focuses on mechanisms how xenobiotics disturb the function of the GC receptors and the release of cytokine Th1. Glucocorticoids such as dexamethasone (DEX) have an aromatic ring that is necessary to identify the GC receptor, and they have an agonistic reagent that "activates" the receptor. Pharmaceutical research provided evidence that certain (non-steroidal) medications with a similar structure, such as NSAID1, have an anti-inflammatory effect. A delayed allergy may be cell mediated via GCs if the agonistic reagent is missing and the GC receptor is only blocked by a substance (antagonistic binding to the GC receptor). In the case of structurally similar xenobiotics, it is thus likely that they disrupt the flow of signals between the GC receptors and the hypothalamus. This causes the inflammatory reaction of the body to persist despite removal of the pathogen. For example, the dyestuff tartrazine is assumed to be able to bind to the GC receptor as tartrazine has a structure very similar to NSAID1, but does not activate the receptor since the agonistic reagent necessary for this is missing. Several studies in which hypersensitivity reactions of the type described here occurred after exposure to tartrazine have been documented. Therefore, we identified some substances that are similar to tartrazine including four neonicotinoids, for example, that are used as insecticides. We recommend investigating whether the substances listed here reach their target, e.g. pulmonary epithelial cells, also in this form (stability testing), sufficiently accumulate there, and – if answered in the affirmative – whether they have a similar interaction with the GC receptor or act as allergens. Another reason why we regard this as a "new" end point is that the regular testing programme of chemicals does not include the determination of the immunoglobulin D (IgD) antibody levels that are considered here to be possible evidence of a specific type of allergy.

#### Sensitivity to environmental pollutants in ageing

The endoplasmic reticulum (ER) plays an important role in the folding of proteins. If folding does not proceed properly, the accumulation of misfolded proteins may result in cytotoxic effects, e.g. in the brain. It is assumed that the heavy metal lead, for example, has an impact on the endoplasmic reticulum via its effect on potassium ho-

homeostasis and thus contributes to typical age-related diseases (such as Huntington's disease and Alzheimer's disease). A similar mechanism is postulated for various other substances on the basis of gene expression analyses, e.g. for nonylphenol, di-(2-ethylhexyl)phthalate and methoxychlor. Since the efficiency of various specific protective mechanisms (formation of chaperones in the ER that are responsible for correct folding; degradation of misfolded proteins via the ERAD mechanism) is markedly impaired in the aged organism anyway, it seems to be plausible that such stress caused by the mentioned xenobiotics on and in the endoplasmic reticulum would also contribute to these typical age-related diseases. The mechanistic findings allow the specific verification of such a hypothesis. In addition, a combined effect is suspected (increased damage to the endoplasmic reticulum through joint exposure to these substances).

### **Combined effects**

As indicated, findings on the mode of action of an individual substance also provide evidence that, after joint exposure to further similar substances, a combined effect, where both an intensification of effects and competitive behaviour of these similar substances may play a role, is expected to occur rather than an independent effect. We pursued this aspect:

- By evaluating in detail a previously known mode of action, *i.e.* the effect of substances via the Ah receptor and the relevance of the consequences in the case of exposure to several chemicals that act via this receptor,
- By carrying out a mechanistic discussion on how different substances are able to induce cardiovascular effects together, either on the basis of their similarity or on the basis of their adverse, but supplementary effects, and
- By evaluating examples from literature, in which (a) there were mechanistic considerations of a combined effect or (b) mixtures of substances were actually tested and the combined effect was compared with the effect of the individual substances.

### Mixtures and Ah receptor-mediated effects

"Toxicity equivalents" of dioxins and dioxin-like substances are the best known example where biochemical/mechanistic findings have already been applied regulatorily for the assessment of combined effects. Here, interactions of xenobiotics with the intracellular Ah receptor play a key role (the aryl hydrocarbon receptor is a transcription factor that is inactively present in the cytoplasm and translocates into the nucleus after activation by xenobiotics to stimulate the transcription of responsive genes there; these genes are associated with cell growth and cell differentiation; a physiological ligand of the receptor is not known to date). It can be demonstrated that the effects of various mixtures of tetrachlorodibenzodioxine, pentachlorodibenzofuran and polychlorinated biphenyl 126 actually correlate very well with the toxicity equivalents. However, a more detailed analysis also shows that mixtures of substances that interact with the Ah receptor may have effects that are inconsistent with a simple linear correlation. For example:

- Metabolites inhibiting the usual Ah receptor-mediated mechanism can be formed via interaction with the Ah receptor (probably by inhibition of an enzymatic degradation of cytochrome or by overexpression of this cytochrome),
- A mixture of the closely related polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) may contain receptor agonists (such as benzo(a)pyrene) and antagonists (such as fluoranthene) at the same time, which means that consequences from inconsistent effects that cannot exactly be quantified to date would have to be considered in spite of the same mechanism if there were a combined effect.

These examples also show that the observation of a certain mode of action (“interacts with the Ah receptor”) – basically correct as such – is not always sufficient to be able to make quantitative predictions about the potency after combined exposure with the required reliability.

### Complex mixtures and cardiovascular diseases

Today, cardiovascular diseases are among the most common lifestyle-based conditions, although this effect is not reproduced when individual substances are tested in animal studies. Therefore, too little relevance may currently be attached to environmental chemicals. However, in epidemiological studies for example, a close correlation has been established between combined exposure to dust, exposure to diesel soot or tobacco smoke and cardiovascular diseases. However, there is no mechanistic understanding of the relationship or it must be extended.

Since hypertension is closely related to cardiovascular diseases, mechanisms that impair the vasodilatation of the blood vessels may play a role. Nitrogen monoxide (NO) is an important factor in the signal transduction of vasodilatation. Redox-reactive hydrocarbons in diesel engine emissions can inhibit the activity of the NO-synthesizing enzymes. This leads to a lowering of the NO level and thus of the vasodilatory activity. The EDHF (endothelial-derived hyperpolarisation factor) is also of central importance in vasodilatation. For example, an epoxidised fatty acid, the epoxidation of which is catalysed via CYP450, plays a key role in the EDHF system. However, disturbances by reactive oxygen species (ROS) and Ah receptor-active substances interfere with the activity of the CYP450 enzymes (e.g. lower CYP induction), which in turn impairs the EDHF system and thus the desired vasodilatation. Polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne dust, tobacco smoke and diesel soot contain Ah receptor-active substances and also cause hypertension in this way. Diesel soot emissions, for example, lead to increased ROS production with specific effects.

These reactive oxygen species also cause oxidation of the low-density lipoprotein (LDL) circulating in the blood, which is of relevance in the development of atherosclerosis. The oxidised LDL (oxLDL) is taken up into the cell via a specific receptor, which is overexpressed by the increased amount of oxLDL, and this in turn leads to an additional increase of ROS in the cell. This ROS production exceeds the detoxification capacity of endogenous antioxidants and thus induces further damage, e.g. necrosis or apoptosis in cells with damaged DNA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a component of the cellular repair mechanism (of base excision repair). This enzyme may not cope if there is excessive DNA damage, e.g. after a combined effect of the substances mentioned, and may induce the above-mentioned cell death instead of repair.

This fact is of particular interest because mixtures of substances do not only reveal mechanistic relationships, but it is also obvious that interactions become so complex that it is very difficult to draw more exact quantitative conclusions despite a better mechanistic understanding. Consequently, the oxidising potential in mixtures, for example, is a helpful parameter in detecting its possible influence on cardiovascular diseases as well as its effect on NO production. Substances inhibiting the interaction of PARP-1 with DNA are to be regarded as particularly critical. However, it seems that no quantitative conclusions about the considered combined effects can currently be drawn on this basis.

#### Examples from literature with combinations of substances tested and a common mode of action

The pesticides fenarimol, vinclozolin and acephate are widespread plant protection products that have been assessed as individual substances. All three substances are substrates for enzymes of the P450 enzyme family and induce CYP in the same way. As a result, CYP-dependent enzymes can also be expressed to an increased or decreased extent. For example, the mentioned pesticides lead to increased hydroxylation of testosterone in the (mouse) liver, which can be seen from the increased testosterone hydroxylase activity. A study investigated the way in which certain mixtures of the mentioned pesticides lead to CYP induction, on the one hand, and NADPH reductase activity, on the other hand, as well as to various other CYP-dependent enzyme activity changes. The results show no clear-cut pattern and do not allow the prediction of an antagonistic, synergistic or additive effect of the substances in the mixture. This example demonstrates how questionable it may be to draw conclusions from the testing of individual substances to the interaction of mixtures and how much uncertainty may be involved if a prediction is transferred from one mixture to other mixtures.

Another study investigated the effects of various plasticisers (phthalates and adipates) and of structurally related substituted phenols, which are used as components of plastics or additives in plastics. Phenolic components of herbicides were also tested. The common oestrogenic effect and the influence on thyroid hormone regulation were considered in more detail:

Simultaneous exposure below the effect level (NOAEC) of the individual compounds did not yet lead to receptor activation. However, the effects were increased after simultaneous exposure to the individual effect concentrations (LOAEC). Deviation from additivity was low. The simple conclusion that the oestrogen receptor was involved in the mode of action does not provide sufficient information for defining the type of influence that several components had on the effect.

In the combined effect study with regard to thyroid hormone regulation with simultaneous exposure to several components, each at its individual NOAEC, the effect of the mixture was the same as that of the individual substances (no changes due to interaction). A stimulating effect on proliferation was observed for the LOAEC, but the level was lower than the maximum values of the most effective individual substances. The effects of the mixture were subadditive. The complex influences on (triiodothyronine-) T3-induced cell growth show how difficult it is to formulate a generalisable prediction of the effects of complex mixtures even if mechanistic elements are included in the analysis.

## Structure-activity analysis to identify “new” toxic end points

Even today, efforts are being made to avoid animal studies. Structure-activity relationships (SAR) and quantitative structure-property/activity relationships (QSPR/QSAR) may be used instead. The corresponding “*in silico*” method is not always based on a mechanistic background. The possibility of including mechanistic considerations in (Q)SAR models was investigated, and the attempt was made to apply QSAR models to the above-characterised “new” end points and the example substances discussed here.

### Mechanistic considerations in the (quantitative) structure-activity relationship

Two different approaches are generally applied for (quantitative) structure-activity relationships:

- Rule-based systems
- Statistical methods

In rule-based systems, empirical rules that were established or examined by experts are systematised by means of computers and applied to predict the presence or absence of specific properties. An essential basis for this is the presence or absence of specific functional groups in a molecule that, for example, are known to be responsible for a specific effect. An advantage of this approach is that there are generally ideas about the mode of action. A disadvantage is that the range of experience cannot be extended by means of the expert system since the prediction is based on rules that are already known, *i.e.* quite a large database is required.

For the statistical approach, it is also desirable to have a mechanistic basis (see validity criteria of the OECD for QSAR), but this is not always the case. Instead, the effects and structural elements of a chemical molecule are correlated according to different statistical methods. A disadvantage of these procedures is that no mode of action can be derived from the system, but further expert knowledge is required. An advantage is that new hypotheses about molecular properties can be established by induction, such as bioavailability or the ability of a substance to inhibit or intensify the function of a specific protein in the organism (“extension of the range of knowledge”). However, all approaches are based on the key assumptions that generally similar molecules (or at least similar partial molecular structures) lead to similar effects and that a certain experimental database is necessary to obtain conclusive and reliable results.

### Application to findings on “new” end points

For the above-described examples (type-2 alkenes and neurodegeneration; potential glucocorticoid antagonists with allergenic effects), QSAR models were also used to investigate whether these models might allow a prediction to be made about the assumed effect. However, no QSAR models are available for neurodegeneration and delayed hypersensitivity reactions and thus no relevant predictions can be made. In most cases, the more broadly defined end points (neurotoxicity and immunotoxicity as an estimate) are not (yet) accessible by QSAR models. A reason for this is the absence of a sufficient amount of experimental data of adequate quality with the same experimental configuration. This is currently the decisive obstacle to the establishment of models that would allow predictions to be made about the influence of chemicals on biochemical parameters. Accordingly, neither are there adequate sub-

stance-specific experimental tests for verifying the postulated effects nor can the relevance of the chemicals related to the effects considered here be examined by means of QSAR predictions. Thus, the mechanistically based hypothesis cannot be verified by QSAR although good QSAR models may also support a mechanistic hypothesis or require such a hypothesis for meaningful data interpretation (a mechanistic hypothesis is the basis for the selection of the experimental data used for modelling). However, its use for regulatory toxicology (as was for example the case for the optimisation of medication active ingredients) would be an essential impetus for the development of QSAR models. Some modules are being developed for the prediction of immunotoxicity and (delayed) hypersensitivity reactions as well as for the "passage of the blood-brain barrier". Therefore, at least for these ("substitute") end points, it is expected that possibilities of prediction will be available in the near future.

## **Mechanistic approaches in regulatory toxicology, status, research activities and further approaches**

### Current relevance in regulatory toxicology

The majority of the current OECD tests for the characterisation of the toxicological properties of a substance are based on end points and the mechanism is left as a black box. Most requirements pursuant to the European chemicals legislation (REACH) are to be addressed in the form of tests on effects. However, there are mechanism-based tests for individual end points: the mouse local lymph node assay (LLNA; OECD TG 429) is one example.

In other fields, for example in the field of phototoxicity (e.g. 3T3 NRU test; OECD TG 432), regulatorily recognised and standardised *in vitro* replacement methods for animal tests that use a mechanistic background have already been established. The absence of genotoxicity can be maintained sufficiently reliably for a substance without carrying out animal studies if whole batteries of tests (combination of different tests) are used. Each of the *in vitro* tests applied for this purpose also provides evidence of the mechanism of genotoxicity.

In the European Union, the efforts made to avoid animal studies and standardise applied methods with a focus on regulatory applicability in the testing of chemicals are collected in a database at the Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) of the Joint Research Centre (JRC). Legislation necessitates searching for such alternative, mechanistic approaches and applying them (see REACH). Research is increasingly pursuing this aim and implementing new methods. In order to satisfy the regulatory requirements, it will be necessary to further develop mechanistically based test batteries that can be carried out quickly.

*In vitro* tests are currently often being used for screening purposes. However, these methods are more and more frequently also being applied to elucidate the modes of action or understand them better. In most cases, they are not sufficient to replace the animal study. Most of the tests have not yet been validated and their regulatory relevance has thus not been established.

### Comparative Toxicogenomics Database

The Comparative Toxicogenomics Database (CTD) is a tool to identify genes, for example, that interact with a specific chemical. Furthermore, the diseases associated

with such an interaction, *i.e.* a possible relationship between a chemical and a disease, are specified. It is based on journal articles included in the PubMed literature database. In addition, the NLM database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>) is referred to for associations between a gene and a disease, and the KEGG system (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) is consulted for information about signal transduction (pathways).

The database is updated every month and, for example, currently (as of: October 2009) includes about:

- 195,000 chemical-disease associations
- 190,000 chemical-gene interactions
- 670,000 gene-disease associations

One of the great advantages of the CTD is that the data were prepared with great care and effort for example to standardise the vocabulary used and organise it (hierarchically).

The database offers an abundance of different search options and tools, and the results include many links (up to the underlying PubMed entry). The CTD generally offers the possibility to obtain information about potential diseases mediated by chemicals via the different relationships and is certainly unique in this form. A list of possible diseases associated with a chemical can be accessed merely by entering the chemical's name.

However, the references provided are often of an indirect nature and the underlying data must be critically reviewed in detail, but they can be used as information for further searches. CTD is only one database with toxicogenomic information, although it is the most important one for toxicological questions.

### The concept of the U.S. EPA

In 2007, an expert commission of the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) and of the U.S. National Institute of Environmental Health Services (U.S. NIEHS) at the National Research Council (NRC) published a fundamental report: "Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy". The publication is a central document in current regulatory toxicology. The considerations of the NRC and EPA are based on an analysis of the shortcomings in the current procedure of toxicological risk assessment. The team of experts established specifically for this purpose considers the following issues to be restrictions in the current approach applied for the study of the toxicity of chemicals:

- Basic uncertainty in using data from animal studies,
- Extrapolation of a high dose (animal study with a small number of animals) to a lower dose with human relevance,
- Requirement of a complex and expensive development of ever more end point-related tests because relevant end points have not adequately been addressed in the previous test system making corresponding retesting of substances necessary,
- The ethical problem of animal protection,

- Aggravation of the last problem in view of the requirement for more extensive testing of additional toxicological endpoints for further substances (central subject in REACH),
- The extremely high costs involved,
- The insufficient possibility of a characterisation of mixtures, and
- Insufficient assignment to risk groups or stages of life.

Against this background, the current test strategy is considered to be a dead end and a “completely new” concept is suggested. The new concept of the NRC is a bottom up approach. Data on physicochemical and biochemical parameters are to be determined and used to establish or predict the toxicity of a substance in humans. In this way, verification via animal studies is required less frequently and may be used specifically.

In order to realise such a concept, it is essential that numerous substance-specific data should be obtained that provide information about the interaction of substances with the organism, e.g. via *in vitro* systems. State-of-the-art, elaborate methods (e.g. Genomics, Proteomics and Metabonomics) are now available for this. Predictions about properties and toxicity are to be made based on already existing data and computer-based models. For this purpose, the EPA created the information network ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource). The predictive EPA programme ToxCast™ is associated with ACToR: During the first phase of this programme, a toxicological profile was established and stored in this database for more than 300 chemicals whose toxicological profiles are known from *in vivo* tests (validation set). Toxicity was also assessed for these substances by means of *in vitro* and *in silico* methods. The Comparative Toxicogenomics Database CTD discussed above is also integrated in ACToR.

Based on these activity profiles, the attempt was made to generate a pattern for the prediction of toxicity in *in vivo* tests. In the second phase, predictability is to be increased and a more differentiated selection of chemicals is to be tested. In the third and simultaneously most important phase, the knowledge that was collected in phases one and two is to be used to set priorities for the chemicals to be tested.

Searches in both ToxCast and ACToR require a harmonised language and conventionalised entry of the chemical structure. The system for this is supplied via the DSSTox project (Distributed Structure-Searchable Toxicity Database Network).

The consistent methodological use of recent knowledge in an integrated approach is something completely new. However, in general, the individual elements, e.g. determination of toxicity via mechanistic studies, use of Genomics, integration of QSAR elements, etc., are approaches that have increasingly been pursued for some time now and, in individual cases, have already been in use for 10 years.

## Conclusions

The above considerations have shown that this project of the German Federal Environmental Agency began to deal with a highly topical issue in the development of concepts for toxicological tests and their integration in regulatory toxicology very early on. Similar discussions, which have only recently led to initial (provisional) re-

sults, were only started in the U.S.A. shortly before. This issue is currently being pursued intensely in the United States by means of the “Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy” concept. However, the fact that the American authorities underline its visionary character also demonstrates that we are still at the beginnings of using a toxicological approach that is based on (mechanistic) toxicity pathways, and a strategy must initially be developed to realise this vision.

Accordingly, by considering new end points and mixtures, the Federal Environmental Agency deals with one aspect of this paradigm shift in regulatory toxicology that is both very ambitious and still has a particularly visionary character. On account of the complexity, mechanistic uncertainty and limited data available on the “new” end points (such as Alzheimer’s disease, specific immunotoxic mechanisms or ageing), it is not yet possible to establish hypotheses with sufficient reliability and validate them comprehensively. Considerations of mixtures have shown that, due to an abundance of competing and interacting mechanistic steps, in this field it is also currently still difficult, to identify the toxicity pathway decisive for the resulting total effect and to draw (at least semi-)quantitative conclusions.

In our opinion, it is nevertheless essential to continue the considerations made here and, as regards the effect of chemicals, to draw more attention to those “new” end points that have hardly been considered in the past as well as to develop methods for giving qualified answers to the adverse effects of heterogeneous mixtures with a complex composition of substances. We would thus welcome if

- The above-mentioned furan compounds were investigated in more detail with regard to their metabolism (formation of type-2 alkenes), their potential to reach the target cells (passage of the blood-brain barrier) and their capacity to disturb the neurotransmitter transport as a substituent of nitrogen monoxides,
- The compounds mentioned in connection with delayed immunotoxicity (fibrinil and neonicotinoids) were investigated in detail as to whether they reach the glucocorticoid receptor, lead to a specific interaction with the receptor and accumulate in the lipid/water boundary layer,
- The compounds or groups of substances mentioned in connection with the effects of ageing (phthalates, nonylphenol and methoxychlor) were investigated in detail for their neurotoxic effects and the mechanisms decisive for this. Initially, the available data (citations according to the Comparative Toxicogenomics Database CTD) would have to be analysed in the original and assessed for their validity.

Even if some of the hypotheses put forward on the similar effect of the considered substances will – as expected – not be substantiated, the examples are helpful to increase the validity of approaches based on effects and to more appropriately include further, and possibly necessary, secondary conditions.

For mixtures with a small number of interacting substances, it would be helpful to detect commonly affected end points and/or commonly affected alterations in gene or protein expression by means of the CTD to verify such postulated alterations in gene or protein expression experimentally for the specific mixture and to carry out tests on effects with regard to particularly relevant effect end points that can justifiably be assumed to exist.

Furthermore, the following proposals should be realised:

- If the Federal Environmental Agency initiates risk assessments for individual substances, the client might generally be required to increasingly document and include findings on modes of action as part of the substance report. Although current Risk Assessment Monographs frequently contain a passage in which the mode of action is mentioned and considered to be the key effect, they generally do not include any information that is for example generated in “omics” analyses or stored in the CTD. This consideration may also be of interest to end points that are initially not assessed as critical, quite in line with the “new” end points that are the subject of this report.
- Accordingly, for end points for which the available data do not allow a final assessment to be made, substance assessments should include considerations from crystallographic methods together with toxicity pathways in READ-ACROSS assessments even if current (Q)SAR models do not yet address the specific end point.
- Some suitable high-throughput screening (HTS) methods are already available for end point-related research. They should be used to specifically generate individual priority substances for more specific tests on this basis and to enter data offering an improved database to other users on an international level. Decisive progress has thus been made that opens up possibilities of application for the end point of developmental neurotoxicity. A comprehensive review has yet to be made of the specific suitability and validation of the present HTS methods or other biochemical/mechanistic approaches for identifying toxicity pathways (e.g. also of the *in vitro* methods according to ECVAM) as well as of the corresponding databases, nor was it generated within this project. A qualified documentation that would allow analyses related to end points of effect (e.g. related to the above-mentioned example of developmental neurotoxicity) would thus be desirable as an important basis for the improved use of this instrument. Such a documentation should regularly be updated and supplemented.
- More comprehensive knowledge of toxicity pathways will pose a problem for the previous method of risk assessment and the assessment of limit values for chemical substances and mixtures. The no adverse effect level (NOAEL) or the corresponding effect concentration (LOAEL) are key elements of current assessments. We estimate that it would be an important task of regulatory planning to initiate a new taxonomy of the term of adversity in view of biochemical or cellular changes and disturbances far below the adverse effect observable from outside.

## 0 Einführung

Zur Erfassung der Toxizität von Umweltchemikalien oder industriell eingesetzten chemischen Substanzen und zur Ausfüllung von regulatorischen Auflagen (Einstufung, Grenzwertableitung) wurde bislang vorwiegend eine apikale (auf den sichtbaren Effekt orientierte) Herangehensweise gewählt, wobei die molekularen Grundlagen der beobachteten Effekte oft im Verborgenen blieben. Die „black box“ wurde in Kauf genommen. Parallel und weitgehend getrennt davon wurden in der Grundlagenforschung biochemische Prozesse betrachtet, oft ohne systematische Auswertungen für Testprogramme, etwa zur gezielteren Testung, zur Überprüfung von Stoffinteraktionen in Gemischen oder zur Aufdeckung neuer toxikologischer Endpunkte, vorzunehmen.

Die Frage ist nun, ob und wo durch diese Vorgehensweise möglicherweise wichtige Erkenntnisse zu toxikologischen Stoffeigenschaften bislang unerkannt blieben. Dafür sind die Chancen und Grenzen von Konzepten zu prüfen, die von biochemischen und zellulären Ereignissen ausgehen: diese Konzepte bemühen sich, die zugrunde liegenden Wechselwirkungen zwischen dem chemischen Stoff und dem Organismus (also die *Wirkmechanismen* auf biochemischer Ebene) aufzuklären, systematisch zu erfassen und die molekularen Netzwerke, welche durch einen Chemikalie gestört werden, aufzuzeigen. Diese Betrachtung bezieht sich also auf die *Toxizitätspfade* („toxicity pathways“). So wird der Terminus in der jüngsten Fachliteratur bezeichnet, der diese Überlegungen aufgreift (NRC, 2007). Toxizitätspfade sind zelluläre Reaktionskaskaden, bei denen – wenn sie hinreichend gestört sind – erwartet werden muss, dass sie zu für die Gesundheit nachteiligen Effekten führen.<sup>1</sup> Die Toxizität von Chemikalien, die dasselbe biologische System beeinflussen, soll mit den Kenntnissen über die Toxizitätspfade besser (vollständiger, differenzierter, mit geringem Aufwand an tierexperimentellen Tests) abgeschätzt und vorhergesagt werden.

Auf diesem Hintergrund soll im Folgenden zunächst anhand von wichtigen biochemischen Prozessen beschrieben werden, wie diese ablaufen und wie diese durch Einwirkung von Fremdstoffen gestört werden können (Abschnitt 2). Die entsprechenden Betrachtungen stellen eine Einführung dar, die einen anderen Blickwinkel gegenüber der nur auf den Effekt fixierten Herangehensweise darstellt.

Es kann vorausgesetzt werden, dass Wirkungen von Stoffen, die sich unmittelbar in makroskopisch oder in histologisch sichtbaren Schädigungen niederschlagen, bei den üblichen Testprogrammen erkannt werden; also zu deren Vermeidung nicht notwendigerweise ein tieferes Verständnis des Wirkungsmechanismus erforderlich ist. Auch die üblicherweise vorgenommenen Testungen auf toxikokinetische Parameter und pathologische Prozesse anzueigende Analytik (zum Beispiel hämatologische Auswertungen) können zahlreiche gesundheitsrelevante Wirkungen indizieren. Es gibt jedoch auch relevante Endpunkte, die nicht leicht und nicht unmittelbar entdeckt werden, wenn das Untersuchungs- und Testinstrumentarium nicht gezielt darauf abgestellt ist. Solche Wirkungen können möglicherweise unentdeckt bleiben.

---

<sup>1</sup> „Toxicity pathways are cellular response pathways that, when sufficiently perturbed, are expected to result in adverse health effects“, NRC, 2007

Beispiele dafür sind

- gesundheitliche Wirkungen, zu denen es kein geeignetes Tiermodell gibt (z.B. in der Neurotoxizität, einige immunologische Veränderungen),
- gesundheitliche Wirkungen, die es stark verzögert auf treten (z.B. prä- oder früh postnatal initiierte Veränderungen, die erst im Alter zu einer erhöhten Empfindlichkeit oder direkt zu Gesundheitsschäden führen),
- gesundheitliche Wirkungen, die es so komplex im Zusammenwirken endogener und exogener Faktoren sind, dass sie nicht monokausal einem Stoff zugeordnet werden können, so dass ein tieferes Verständnis für den Mechanismus erforderlich ist, um die Relevanz des Beitrags eines bestimmten Stoffs erfassen zu können (z.B. krebserzeugende Wirkung, endokrine oder kardiovaskuläre Effekte),
- gesundheitliche Wirkungen, die sich erst in Wechselwirkung mit weiteren Agenzien ausprägen, die jedoch grundsätzlich nicht alle umfassend in beliebigen Kombinationen systematisch getestet werden können.

Ferner gibt es eine Reihe von Wirkungen, die zwar grundsätzlich mit klassischen Tests entdeckt werden könnten, die jedoch möglicherweise deshalb unentdeckt bleiben, weil es sich nicht um Substanzen handelt, die mit großer Tonnage auf den Markt gebracht werden. So richtet sich das Testprogramm der Europäischen Chemikaliengesetzgebung (REACH) nach der in Verkehr gebrachten Menge. Für kleine Tonnagen müssen Mehrgenerationentests oder Langzeittests nicht standardmäßig vorgenommen werden. Hier könnte es helfen, aus der Betrachtung von Toxizitätspfaden Anhaltspunkte zu gewinnen, wo im Einzelfall doch mit gezielten Tests Verdachtsmomente abgeklärt werden sollten, obwohl dies systematisch nicht zu den Standardprüfungen zählt.

In Abschnitt 3 dieses Berichts werden an den Beispielen

- der Neurodegeneration,
- der verzögerten allergischen Reaktion,
- des Einflusses von Schadstoffen auf die Alterung

Toxizitätspfade beschrieben, die einen Ausgangspunkt für solche gezielte Testungen von bestimmten Stoffen darstellen können.

Meistens sind mehrere Umweltchemikalien aufzulisten, die (teilweise) einen gemeinsamen Toxizitätspfad besitzen. Daraus lassen sich somit nicht nur Erkenntnisse für den Einzelstoff ermitteln, der sich ähnlich anderen Stoffen verhält, sondern es lässt sich auch unterstellen, dass bei gemeinsamer Exposition eine Kombinationswirkung zwischen diesen ähnlichen Stoffen auftritt. Hier kann die biochemische Betrachtung des Wirkungsmechanismus dazu beitragen, den Begriff der Ähnlichkeit zu präzisieren und Hypothesen für Interaktionen aufzustellen.

In Abschnitt 4 betrachten wir solche Kombinationswirkungen:

- Wir gehen von dem (bereits umfangreich beschriebenen) Wirkungsmechanismus über den Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor („Aryl-Hydrocarbon“- oder Ah-Rezeptor) aus und können daran erläutern, wie hilfreich hier die mechanistischen Erkenntnisse bei Betrachtung von Gemischen sind. Wir können aber

auch Grenzen erläutern, wo die Informationen für den gemeinsamen Toxizitätspfad nicht ausreichen, um das Zusammenwirken korrekt vorherzusagen (Abschnitt 4.2).

- Wir prüfen ferner die komplexen Mechanismen bei kardiovaskulären Erkrankungen und die verschiedenen Agenzien, die bei diesem Gesundheitsleiden im Zusammenwirken eine Rolle spielen können (Abschnitt 4.3).
- Schließlich werden in Abschnitt 4.4 zwei Studien zu endokrinen Effekten referiert, die gezielt mechanistische Informationen als Studienhypothese für die prognostizierte Kombinationswirkung nutzen.

Es wäre jedoch falsch anzunehmen, dass mit dem Begriff der Toxizitätspfade etwas gänzlich Neues entwickelt worden wäre, was nun dem Althergebrachten als Alternative gegenüberzustellen ist. Wie angedeutet, haben die Ebene der biochemisch-mechanistischen Grundlagenforschung und die Ebene der effektbezogenen Stoffbewertung schon lange parallel nebeneinander bestanden. Neu ist die gezieltere Integration der Instrumente, also der Versuch, systematischer biochemisches Wissen bei der Stoffbewertung nutzbar zu machen. In den letzten Jahren wurden in diesem Sinne bereits verschiedene Softwareprogramme entwickelt, die der Analyse von Struktur-Wirkungs-Zusammenhängen (als „structure activity relationships“, SAR, oder „quantitative structure activity relationships“, QSAR) eine Hilfe bieten sollen, Wirkungen von bisher nicht getesteten Stoffen vorherzusagen. Dabei wird teilweise ebenfalls auf biochemische Ähnlichkeitsparameter zurückgegriffen. Abschnitt 4 charakterisiert (Q)SAR-Programme und diskutiert anhand von Stoffbeispielen aus Abschnitt 2, inwieweit (Q)SAR-Modelle auch hilfreich sein können, um neue Endpunkte zu entdecken oder Kombinationswirkungen vorauszusagen.

Mit den Beispielen in Abschnitt 2 und 3 wird inhaltlich verdeutlicht, wie aus der Betrachtung von Toxizitätspfaden Erkenntnisse zur gesundheitlichen Wirkung von Einzelstoffen oder Stoffgemischen gewonnen werden können, wie sie in traditionellen endpunktbezogenen Tests oft unerkannt bleiben würden. Diese sind zentrale Überlegungen, die die Analyse biochemischer Prozesse bei der regulatorischen Methodik fördern. In den USA wurde von der nationalen Umweltbehörde EPA und dem nationalen Forschungsrat NRC ein Programm auf den Weg gebracht, das als „Toxicity Testing in the 21st century, A vision and a strategy“ bezeichnet wird. Abschnitt 5 dieses Projekts berichtet von entsprechenden Initiativen, Forschungsansätzen und Umsetzungen in die Praxis der stofflichen Risikobewertung.

# 1 Toxizitätspfade – Biochemische und zelluläre Ereignisse als Grundlage toxischer Wirkungen von Fremdstoffen

## 1.1 Einleitung

Grundlegende Vorgänge, wie Überleben, Proliferation, Differenzierung und der Tod von Zellen im Organismus beruhen auf biochemischen Ereignissen. Um diese Vielfalt besser überblicken zu können, wird im Folgenden versucht, eine Einteilung in grundsätzliche Prozesskategorien zu treffen und zelluläre Signalgebende Netzwerke, die durch Fremdstoffe gestört werden können, abzubilden. Diese Darstellung von Grundlagen soll über diese Arbeit hinausgehend genutzt werden, um neue Testansätze zu entwickeln und sich den Problemen der modernen Chemikalienprüfung (Reduktion der Versuchstieranzahl; eine Vielzahl an nicht getesteten Stoffen; Testung von Gemischen; bessere Übertragbarkeit auf den Menschen) zusetzen (siehe auch Abschnitt 3). Die dabei von uns gewählten Ebenen besitzen einen beispielhaften Charakter und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Vollständigkeit wird hier jedoch auch nicht angestrebt aufgrund der Fülle der vorkommenden Prozesse und des Rahmens dieses Projekts. Wir richten unsere Aufmerksamkeit stellvertretend auf

- einige allgemeine Stoffwechselprozesse (v. a. energieliefernde Prozesse),
- Transportvorgänge (Aufnahme und Verteilung) und
- die chemische Signaltransduktion im menschlichen Organismus.

Diesen von uns gewählten drei Kapiteln ist das Gros aller biochemischen Vorgänge zuzuordnen. Die Einteilung orientiert sich an den biochemischen Prozessen und nicht - wie es beispielsweise in anderen Ansätzen bereits versucht wurde - an den betroffenen Organsystemen oder chemisch ähnlichen Verhaltensweisen und Strukturen (Derelanko und Hollinger, 2002; Stenersen, 2004; Josephy und Mannervik 2006; Klaassen, 1995; Aktories et al., 2009).

Anhand von Beispielen, vorzugsweise aus dem Bereich der Umweltchemikalien, soll in den jeweiligen Kapiteln dann die Störanfälligkeit der biochemischen Prozesse demonstriert werden. Damit erschließen sich entsprechende Toxizitätspfade.

### *Stoffwechselprozesse*

Wir beschäftigen uns im ersten Teil allgemein mit Stoffwechselprozessen. Hierzu zählt beispielsweise

- die Versorgung der Zellen mit Energie (Wir gehen in unserem Bericht auf ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung und den Citratzyklus ein).

Anschließend beschreiben wir Beispiele für die Katalysatoren aller metabolischen Umsetzungen,

- die Enzyme

und führen bekannte Störungen beider Ebenen auf. Wir erachten diese Unterpunkte als so essenziell, dass wir sie an den Anfang unserer Betrachtungen stellen. Die Grundsätzlichkeit dieser Prozesse spiegelt sich ebenfalls im Aufbau biochemischer Lehrbücher wieder, bei denen diese Themen stets zu Anfang abgehandelt werden (Löffler et al., 2007; Berg et al., 2007; Rassow et al., 2006; Alberts et al., 1983).

### *Transportvorgänge*

Ebenso grundsätzlich ist der Transport über die biologische Membran. Diese besteht aus einer Lipiddoppelschicht und ist somit für die meisten polaren Substanzen undurchlässig. Um intrazellulär wirksam zu werden muss eine Umweltchemikalie zunächst diese Barriere überwinden und ins Zellinnere transportiert werden. Dem Thema Transport widmen sich ebenfalls die Autoren bekannter Lehrbücher (Löffler et al., 2007; Berg et al., 2007; Rassow et al., 2006; Alberts et al., 1983). Weiterhin wird diesem Thema auch in anderen Bereichen große Bedeutung beigemessen: die Erfahrungen, die bei der Entwicklung von pharmakologisch wirksamen Substanzen gemacht wurden, zeigen, dass der aktive Transport über biologische Membranen ein kritischer Punkt für die Festlegung von Fremdstoffeigenschaften ist. Man weiß beispielsweise, dass diverse Aufnahme- und Effluxtransporter, wie das P-Glykoprotein, die „Multidrug resistance“ assoziierten Proteine („multidrug resistance associated proteins“, MRPs) oder die organischen Anionen-transportierenden Polypeptide („organic anion transporting polypeptides“, OATPs) eine große Rolle für die zur Verfügung stehende Menge und die Effizienz eines Pharmakons spielen (Oswald et al., 2007). Dieses Wissen nutzt man für gewünschte positive Effekte wie im Falle der gewollten Verwendung von Chemosensitizern bei der Tumorthherapie, oder aber es kommt - wie später beschrieben - zu adversen Effekten beim Menschen (siehe Abschnitt 1.3.3.1).

### *Signaltransduktion*

Die Signaltransduktion wurde von uns gewählt, weil hier eine in sich geschlossene Abfolge von Ereignissen auftritt („molekularer Schaltkreis“), die gut charakterisiert ist und deren Störanfälligkeit aufgrund der Verzahnung der einzelnen Ebenen deutlich nachzuvollziehen ist.

Es ist nicht trivial, geeignete Beispiele einer durch Umweltchemikalien induzierten Störung zu finden bzw. eine eindeutige Zuordnung der Fremdstoff-vermittelten Störungen zu jeweils nur einer der von uns oben festgelegten Kategorien zu treffen. Die Gründe hierfür sind unterschiedlicher Natur:

- Einerseits sind viele adverse Effekte von Fremdstoffen aufgrund der regulatorischen Erfordernisse und der damit verbundenen apikalen Herangehensweise bekannt, jedoch ist der molekulare Wirkmechanismus bisher dabei eher von nachgeschaltetem Interesse und bleibt somit auf unbestimmte Zeit ungeklärt („Blackbox“).
- Bei anderen Stoffen fällt es aufgrund der Komplexität der ausgelösten Vorgänge schwer, eine eindeutige Zuordnung zu den einzelnen Kategorien und Unterpunkten festzumachen. So sind beispielsweise verschiedene Prozesse auf der Ebene, ihrer Funktionsweise und der Rolle, die sie im Gesamtorganismus einnehmen miteinander verflochten und dementsprechend kann ein und derselbe Vorgang zu unterschiedlichen Kategorien gezählt werden. Dies wird am später beschriebenen Beispiel der Organozinnverbindungen klar,  
s die einerseits die Funktionsweise eines Transportproteins (siehe Abschnitt 1.3.3.1) blockieren,

- s und dadurch gleichzeitig die Energiegewinnung im Organismus (siehe Abschnitt 1.2.1) beeinträchtigen.
  - Bei einem weiteren Beispiel der Organophosphate bzw. Carbamate, in dem
  - s die Funktion eines Enzyms (siehe Abschnitt 1.2.2) verhindert wird, folgt daraus
  - s eine gestörte Signaltransduktion (siehe Abschnitt 1.4.3) mit Auswirkungen für den Gesamtorganismus.
- Neben dieser Schwierigkeit der Zuordnung eines Prozesses zu einer Kategorie erhöht sich die genannte Komplexität zusätzlich durch die Tatsache, dass ein Stoff an mehreren Stellen im Organismus auf unterschiedlichste Prozesse molekular einwirken kann. Auch hier können Organozinnverbindungen als Beispiel fungieren. Wie später ausführlich beschrieben wird, können sie
    - s den Vorgang der ATP-Synthese blockieren (siehe Abschnitte 1.2.1 und 2.2.1),
    - s gleichzeitig jedoch kann aber auch über eine antagonistische Blockade die Glucocorticoid-vermittelte Signaltransduktion (siehe Abschnitt 1.4.1) gestört sein.
- Und auch Blei kann unterschiedliche Wirkungen im menschlichen Organismus entfalten. Einerseits sind
- s über die Inhibition von Enzymen distinkte Stoffwechselprozesse (siehe Abschnitt 1.2.2) betroffen, andererseits kann
  - s über andere Mechanismen die Signaltransduktion (siehe Abschnitt 1.4.1) eingeschränkt sein.

An dieser Stelle bleibt nochmals zu erwähnen, dass diverse Mechanismen, die hier nicht aufgeführt werden, durch Umweltchemikalien gestört werden können. Die Komplexität dieser Beschreibung würde durch eine weitere Erhöhung des Detaillierungsgrades ins Unüberschaubare gleiten. Ein Beispiel soll hier aber zur Verdeutlichung dennoch genannt werden.

Im folgenden Kapitel zum Thema Transport werden die organspezifischen Auswirkungen von Paraquat, welche durch die Verwendung spezieller Transportproteine ausgelöst werden, dargestellt. Der molekulare Mechanismus der Paraquat-vermittelten *Schädigung* hat jedoch mit dem Thema Transport nichts zu tun und wäre dementsprechend als neuer Unterpunkt mit Titel „Aufbau der Elektronentransportkette“ dem Thema Energiehaushalt zuzuordnen (die hierbei anfallende Störung ist z.B. die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies).

Am Beispiel der Organselektivität von Paraquat kann noch auf einen weiteren Aspekt in unseren Betrachtungen hingewiesen werden. Obwohl sich das v.a. lungen-schädigende Paraquat in der chemischen Struktur nicht sehr vom ebenfalls als Herbizid verwendeten Diquat unterscheidet, offenbart das Diquat nicht denselben adversen Effekt (Boelsterli, 2007). Dementsprechend ist eine analoge Wirkung trotz sehr ähnlicher Strukturen nicht zwangsläufig gegeben (siehe Abschnitt 1.3.3.2).

## 1.2 Stoffwechselprozesse

Die Vorgänge im menschlichen Körper beruhen auf biochemischen Prozessen. Es werden kontinuierlich Stoffe aufgenommen, abgebaut, umgewandelt und ausgeschieden. Einige Teilaspekte zellulärer Mechanismen der Energiebereitstellung (z.B. Zellatmung, Citratzyklus) sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Weiterhin beschreiben wir beispielhaft die Katalysatoren der Stoffwechsel- oder metabolischen Reaktionen, die Enzyme. Diese Punkte spielen innerhalb des Themas Stoffwechselprozesse eine zentrale Rolle und wurden gewählt, da ihre Störanfälligkeit durch Fremdstoffe gezeigt werden konnte. Wir führen dementsprechend beispielhaft Umweltchemikalien auf, die in der Lage sind, diese Grundfunktionen und -elemente des Organismus nachhaltig zu beeinflussen.

### 1.2.1 Energiehaushalt: Produktion von Adenosintriphosphat (ATP)

Die Mitochondrien sind die zentralen Organellen einer eukaryotischen Zelle zur Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Sie besitzen eine äußere, permeable Membran und eine innere Membran, in der die Komponenten der oxidativen Phosphorylierung lokalisiert sind. Das Hauptmerkmal der inneren Membran ist ihre Impermeabilität und die damit verbundene Barrierenfunktion. Nur lipophile und ungeladene Moleküle können diese Barriere ohne Hilfe überwinden, ein Beispiel sind Steroide, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in der Lipiddoppelschicht löslich sind. Die Elemente der Elektronentransportkette (ETK) nutzen diese natürliche Barrierenfunktion. Durch die Elektronenübertragung innerhalb der ETK entsteht ein Membranpotenzial über die innere Organellenmembran, da die Matrix negativ und der Intermembranraum positiv aufgeladen ist. Dieses elektrochemische Potenzial ist ebenfalls bekannt als die protonenmotorische Kraft. Der Rückfluss der  $H^+$  vom Intermembranraum in die Matrix liefert Energie, die von der ATP-Synthase (A, siehe ebenfalls 1.3.3.1) genutzt wird um Adenosindiphosphat (ADP) in energiereiches Adenosintriphosphat (ATP) umzuformen. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (Löffler et al., 2007; siehe Abbildung 1-1).

Aufgrund der Eigenschaften der äußeren Mitochondrienmembran, können Fremdstoffe frei über die Membran in den Intermembranraum gelangen. Schwache organische Säuren oder saure Phenole liegen bei physiologischem pH-Wert in ihrer deprotonierten Form im Cytosol vor. Gelangen sie in den Intermembranraum, so werden sie wegen der dort vorherrschenden hohen Protonendichte protoniert. Wie bereits oben erwähnt ist die innere Membran grundsätzlich ein Hindernis und nur unter bestimmten Umständen für Moleküle durchlässig. Im protonierten und somit ungeladenen, lipophilen Zustand sind zuvor schwachen organischen Säuren oder saure Phenole, ähnlich den oben erwähnten Steroiden, in der Lage, über die innere Membran zu diffundieren. Nach dem Durchtritt werden sie durch das negative Membranpotenzial dazu getrieben, das Proton wieder abzugeben. Das negative Anion wird dann aus der Matrix zurück in den Intermembranraum transportiert. Dort angelangt wiederholt sich dieser Vorgang. Der Protonengradient, welcher durch die ETK aufgebaut wurde, wird aufgelöst, die Energie wird in Form von Wärme frei, statt als protonenmotorische Kraft die ATP-Synthase anzutreiben. Man spricht in diesem Fall von einer Entkopplung (Stenersen, 2004; Boelsterli, 2007).

### Beispiel: Entkopplung durch 2,4-Dinitrophenol

Ein klassisches Beispiel für einen solchen Entkoppler ist 2,4-Dinitrophenol (Loomis und Lipmann, 1948). Der zugrundeliegende Mechanismus ist in Abbildung 1-1 schematisch dargestellt. Beim Menschen resultiert daraus die Entwicklung einer akuten Hyperthermie, einer Tachykardie und der Dehydrierung. Über die Zeit werden die Kohlenhydrat- und Fettdepots aufgebraucht. Durch die Hyperthermie und die direkte toxische Wirkung auf das Gehirn wird eine Ruhelosigkeit und Kopfschmerzen induziert, die in schweren Fällen bis hin zu Anfällen, Koma, cerebraler Ödembildung und letztlich bis zum Tode führen kann (EPA, 1999; ATSDR, 1995). Die geschilderten pathophysiologischen Veränderungen können, bis auf die Hyperthermie, nicht in direkten Zusammenhang mit diesem Vorgang gebracht werden; der Wirkzusammenhang bei diesen Veränderungen ist derzeit noch unzureichend bestimmten biochemischen Prozessen zugeordnet.

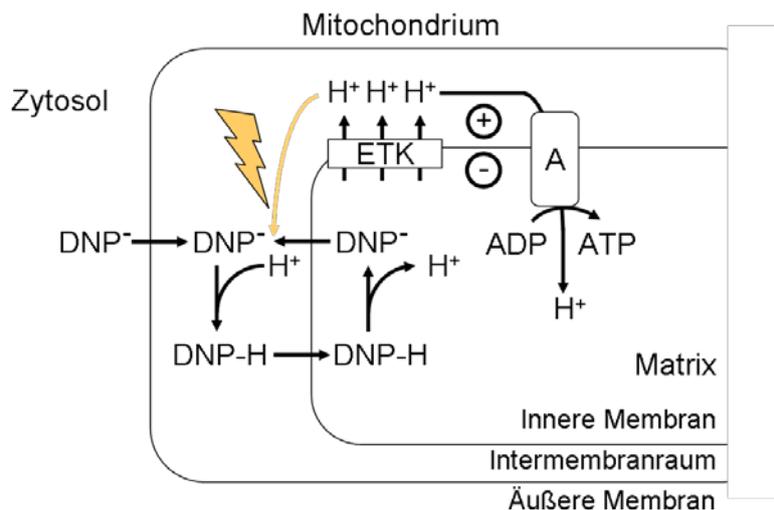


Abbildung 1-1: Mechanismus eines Entkopplers

Die physiologisch grundsätzlich notwendigen Komponenten zur ATP-Synthese sind im Bild schematisch dargestellt. Der Mechanismus der Entkopplung der zellulären Atmung von der ATP-Synthese ist anhand von 2,4-Dinitrophenol (DNP) gezeigt. DNP ist ein chemischer Entkoppler, der aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften die innere Mitochondrienmembran passieren kann. Auf diesem Weg transportiert DNP Protonen zurück in die Matrix und degeneriert das mitochondriale Membranpotenzial, ohne dass ATP produziert wird. ETK, Elektronentransportkette; A, ATP-Synthase; ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintri-phosphat. (verändert nach Boelsterli, 2007)

### 1.2.2 Enzyminhibitoren

Enzyme bilden mit ihrem spezifischen Substrat S einen reversiblen Komplex. Das Substrat wird dabei in ein Produkt P umgewandelt und das Enzym selbst geht unverändert aus dieser Reaktion hervor und steht erneut zur Umsetzung des Substrats zur

Verfügung (siehe enzymatischer Kreislauf, Abbildung 1-2). Der Prozess der Umwandlung ist dabei energieabhängig.

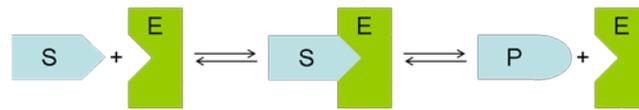


Abbildung 1-2: Enzymatischer Kreislauf

Substanzen, die mit Enzymen interagieren und so deren Aktivität negativ beeinflussen, werden als Enzyminhibitoren (I) bezeichnet. Klassisch ist zwischen der kompetitiven und der nicht-kompetitiven Hemmung zu unterscheiden (siehe Abbildung 1-3). Ein weiteres Charakteristikum eines Inhibitors ist die Reversibilität oder Irreversibilität der ausgelösten Hemmung.

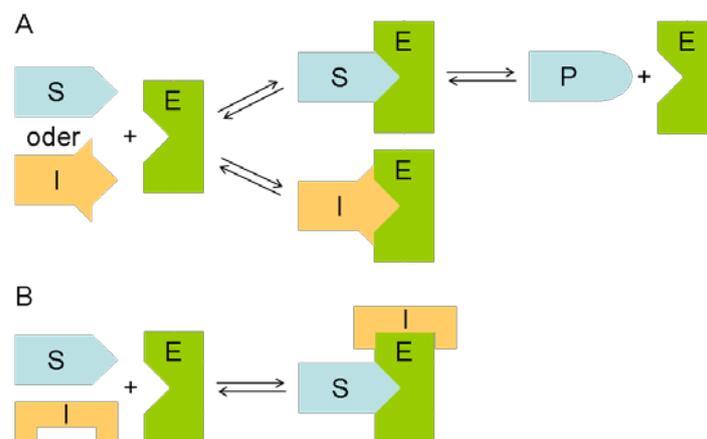


Abbildung 1-3: Schema der Enzymhemmung

**A** Kompetitive Hemmung. Das Substrat konkurriert mit dem strukturell ähnlichen Inhibitor (I) um die Substratbindungsstelle. Es kommt je nach Konzentration und Affinität des Substrats und des Inhibitors mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) oder eines Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI). Dargestellt ist hier ein reversibler Prozess, der Inhibitor kann den EI-Komplex wieder verlassen.

**B** Nicht-kompetitive Hemmung. Der Inhibitor bindet an eine Stelle des Enzyms, die nicht die Substratbindungsstelle ist. Es kann sogar ein Komplex aus Enzym, Substrat und Inhibitor (EIS) gebildet werden. Jedoch findet keine Umsetzung des Substrats mehr statt. Dargestellt ist wiederum eine reversible Hemmung.

### Beispiel: Kompetitive und reversible Enzymhemmung durch Fluoracetat

Ein zentraler Prozess des humanen Organismus zur Energiebereitstellung ist der Citratzyklus. Zunächst muss das aus der Glykolyse stammende Pyruvat in Citrat (dem Einstiegsprodukt des Zyklus) überführt werden. Allgemein liefert der in den Mi-

tochondrien lokalisierte Prozess Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) sowie weitere Reduktionsäquivalente für die Atmungskette. Ein für den Citratzyklus unerlässliches Enzym ist die Aconitase, welche die Umsetzung von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Dieses Enzym kann durch das früher häufig verwendete Rodentizid Fluoracetat kompetitiv und reversibel gehemmt werden. Um toxisch zu wirken, muss dieses Rodentizid im Organismus zunächst zu Fluorcitrat metabolisiert werden, dieser Metabolit ist dann als Enzyminhibitor wirksam (siehe Abbildung 1-4). Der molekulare Mechanismus der Aconitasehemmung durch Fluorcitrat ist bekannt. Die Aconitase besitzt im katalytischen Zentrum ein Eisen-Schwefel-Cluster. Fluorcitrat bildet mit diesem Cluster einen reversiblen Komplex, die Enzymaktivität ist dadurch gehemmt (Eanes und Kun, 1974; Proudfoot, et al., 2006). Pathophysiologisch äußert sich die Hemmung im Auftreten von Krampfanfällen und einer Laktatazidose (Proudfoot et al., 2006). Diese Effekte lassen sich auf molekularer Ebene näher erläutern. Insgesamt leidet die Zelle durch den Stillstand des Citratzyklus unter Energiemangel. Außerdem kommt es zu einer Anhäufung des, aus der Glykolyse stammenden, Pyruvats. Durch ein weiteres Enzym, die Laktatdehydrogenase, kommt es unter diesen Bedingungen zur gesteigerten Umsetzung des Pyruvats zu Laktat (anaerobe Abbau, v. a. in Muskelzellen). Das Laktat wird ins Blut abgegeben, die Pufferkapazität des Blutes ist ab einem gewissen Maß an Laktat erschöpft und es kommt zu einer Ansäuerung (Horn et al. 2005).

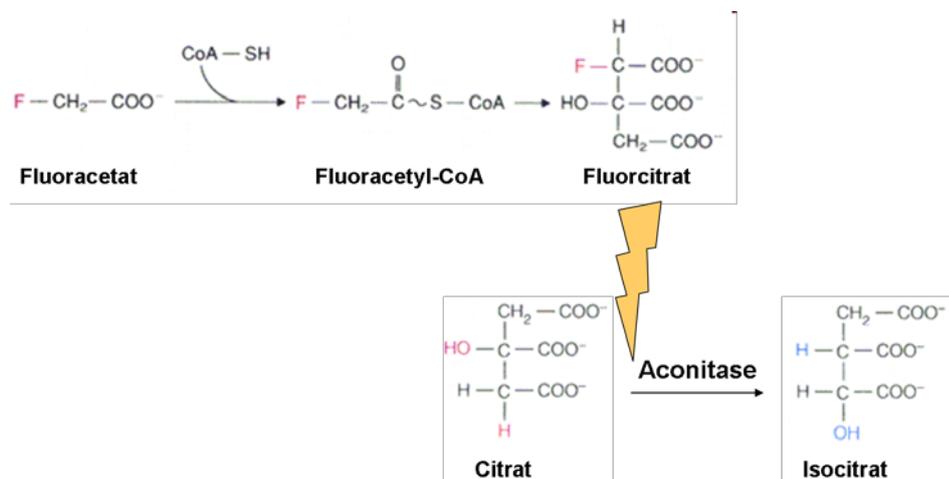


Abbildung 1-4: Durch die Aconitase umgesetzte Reaktion und deren Hemmung durch den Fluoracetat-Metaboliten

Fluoracetat wird als Analog zum physiologischen Pyruvat mit Coenzym A (CoA-SH) zu Fluoracetyl-CoA. Dies wird durch die Citratsynthese zu Fluorcitrat umgesetzt und kann eine Verbindung mit der Aconitase eingehen. Der Citratzyklus der Zelle ist an dieser Stelle unterbrochen.

### Beispiel: Kompetitive und reversible Enzymhemmung durch Blei

Ein weiteres Beispiel für die Beeinträchtigung physiologischer Systeme durch die Fremdstoff-vermittelte Hemmung von Enzymen ist die Störung der Synthese des roten Blutfarbstoffs (Häm) durch Blei (siehe Abbildung 1-5). Innerhalb dieser Synthesekaskade gibt es verschiedene Angriffspunkte für Blei. Die sehr gut charakterisierte

Hemmung der  $\delta$ -Aminolävulinsäuredehydratase ( $\delta$ -ALAD) wird im Folgenden genauer dargestellt.

Blei verhält sich im menschlichen Organismus wie die physiologisch wichtigen zweiwertigen Metallionen Calcium bzw. Zink. In vielen Enzymen sind Metallionen im katalytischen Zentrum der Proteine als Kofaktoren beteiligt und essenziell für die Funktionalität der Enzyme. Die  $\delta$ -ALAD beinhaltet  $Zn^{2+}$  Ionen (Gibbs et al., 1985) die durch die  $Pb^{2+}$  Ionen verdrängt werden und ein inaktives Enzym hinterlassen. Die Hemmung verläuft kompetitiv und ist reversibel durch  $Zn^{2+}$  Ionen (Finelli et al., 1975; Haeger-Aronson und Schütz, 1976).

Der Nachweis der verringerten  $\delta$ -ALAD-Aktivität im Blut ist das erste Anzeichen einer Intoxikation mit Blei (Walker, 1998). Etwas geringere Sensitivität zeigt der Nachweis der sich anhäufenden Metaboliten,  $\delta$ -Aminolävulinsäure und Koproporphyrinogen III, im Urin (Gautam und Chowdhury, 1987; Forth et al., 1987). Pathophysiologisch äußern sich diese Effekte in einer Verfärbung von Haut und Harn und ebenfalls durch das Auftreten einer hypochromen Anämie (durch Eisenmangel bedingte Blutarmut) (Forth et al., 1987).

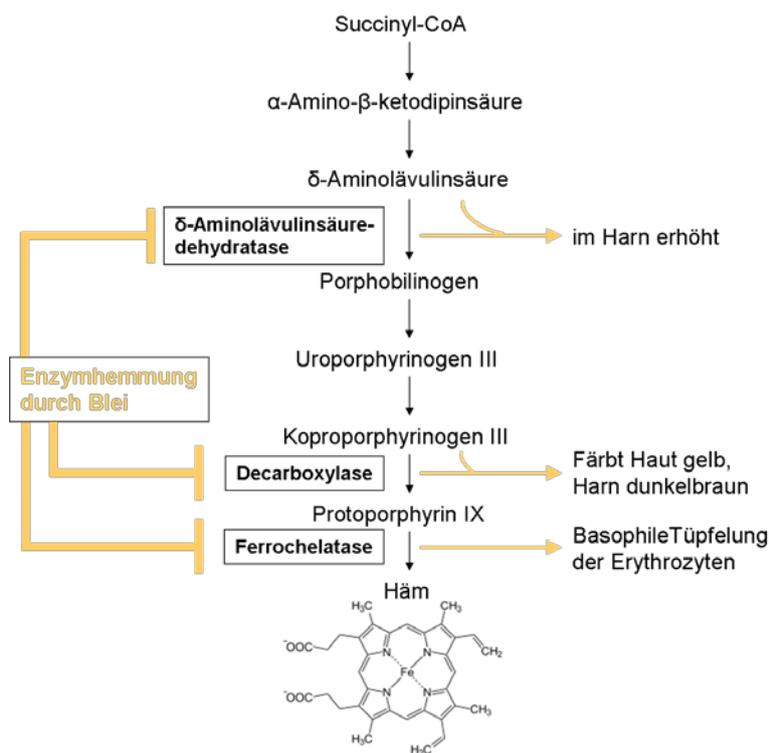


Abbildung 1-5: Schema der Hämsynthese und der drei Angriffspunkte von Blei

Blei kann innerhalb der Hämsynthesekaskade die Aktivität von drei der notwendigen Enzyme beeinträchtigen. Die Zwischenprodukte  $\delta$ -Aminolävulinsäure und Koproporphyrinogen III fallen vermehrt an und werden im Harn ausgeschieden. Die Hemmung des Eiseneinbaus ( $Fe(II)$ Ion) in das Porphyringerüst resultiert in einer Veränderung der Erythrozytenstruktur (basophile Tüpfelung). (verändert nach Forth et al., 1987)

Die Hemmung der D carboxylase und der Ferrochelatase beruhen nicht auf dem oben beschriebenen Wirkprinzip und werden an dieser Stelle nicht ausführlich beschrieben (für weitere Ausführungen siehe Fujita et al., 2002).

### **Beispiel: Nicht-kompetitive Enzymhemmung durch Flavonoide und andere Lebensmittelzusätze**

Da die reine nicht-kompetitive Substrathemmung zu den seltenen Formen der Enzymhemmung zählt, wird im Folgenden die Inhibition von Sulfotransferasen (SULTs) durch die natürlich vorkommenden Flavonoide und weitere Lebensmittelzusätze anstelle eines Beispiels aus dem Bereich der Umweltchemikalien erläutert.

Die cytosolischen SULTs sind Phase II Enzyme des Metabolismus und führen eine Konjugationsreaktion aus. Sie übertragen einen Sulfatrest vom Kosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf das zu konjugierende Substrat. Dieser Vorgang dient dazu, die Stoffe, seien es natürliche endogene oder körperfremde Metabolite, einerseits biologisch inaktiver und andererseits wasserlöslicher - und somit zur Exkretion bereit - zu machen (Coughtrie et al., 1998).

Für die Isoform SULT1A1 konnte von Coughtrie et al. eine nicht-kompetitive Enzymhemmung durch die oft verwendeten Nahrungsmittelzusätze Epicatechin-gallat und Epigallocatechin-gallat nachgewiesen werden (Coughtrie und Johnston, 2001). Der molekulare Mechanismus, d.h. die Bindestelle der Inhibitoren am Enzym (siehe Abbildung 1-3B), konnte jedoch bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Die Art der Enzymhemmung kann man aber anhand von Parametern aus der Enzymkinetik feststellen. Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung ist die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms ( $V_{max}$ ) erniedrigt. Diese Art der Enzyminhibition wurde ebenfalls für weitere Flavonoide und andere gebräuchliche Lebensmittelzusätze gefunden (Moon et al., 2006; Ghazali und Waring, 1999; Eaton et al., 1996; Bamforth et al., 1993).

Die Enzymhemmung der SULTs durch Fremdstoffe oder Lebensmittelzusätze kann adverse oder protektive Effekte herbeiführen:

Zu adversen Effekten beim Menschen kann es kommen, da die Detoxifikation von Metaboliten gestört ist. Bamforth *et al.* berichtet zum Beispiel, dass es zu einer Nahrungs-induzierten Migräne kommt, aus gelöst durch die fehlende Sulfatierung von Neurotransmittern und in der Folge nicht zu deren Inaktivierung und Ausscheidung (Bamforth et al., 1993).

Durch die Konjugation von Sulfat an Fremdstoffe kann es zur Aktivierung von pro-mutagenen und pro-karzinogenen Fremdstoffen kommen, wie bei spielsweise hydroxymethylierten polzyklischen Kohlenwasserstoffen, Aethylalkoholen, Phenolen und N-Hydroxylaminarylen (Glatt, 2000).

Andererseits wird die Inhibition der SULTs von anderen Autoren als chemoprotektive Reaktion eingestuft. In Fällen von einer durch die Sulfatierung aus gelösten Kanzerogenese (siehe oben genannte Beispiele) fällt durch die Enzymhemmung auch die Aktivierung der Pro-Mutagenen und Pro-Karzinogenen weg (Moon et al., 2006; Eaton et al., 1996). Die Enzyminhibition kann dann als protektiv gesehen werden.

### **1.3 Transportvorgänge**

Zellmembranen bestehen grundsätzlich aus einer Phospholipiddoppelschicht, in der zusätzlich je nach Zelltyp verschiedene Proteine und Lipide dynamisch integriert sind. Weiterhin ist das Zellinnere in verschiedene Kompartimente untergliedert, wo-

durch die teilweise gegenläufigen Stoffwechselprozesse, energetisch sinnvoll, voneinander getrennt werden. Auch diese Kompartimente sind von einer Phospholipiddoppelschicht umschlossen. Der extrazelluläre Raum und die intrazellulären Kompartimente stehen mit dem Cytosol über aktive und passive Transportsysteme in Verbindung. Der aktive Transport unterscheidet sich vom passiven Transport durch den Verbrauch von Energie und der Möglichkeit einen Stoff in einem Kompartiment entgegen einem Konzentrationsgradienten anzureichern (Löffler et al., 2007).

### 1.3.1 Transportproteine

Die Translokation von hydrophilen Stoffen über Membranen kann bis auf wenige Ausnahmen nur durch spezielle Transporter erfolgen. Es gibt drei grundsätzliche Arten - Uniporter, Symporter und Antiporter (siehe Abbildung 1-6).

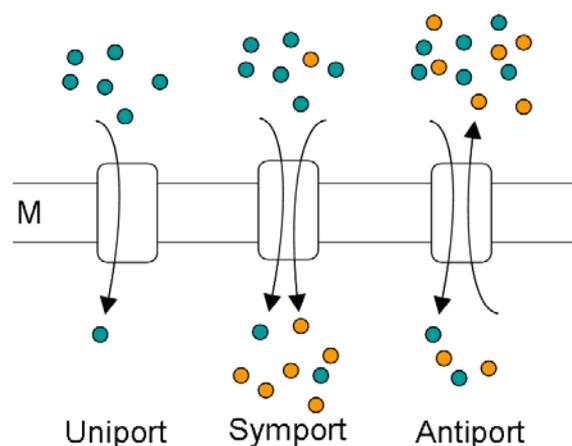


Abbildung 1-6: Prinzipien des Transports

Die Transportproteine sind in der biologischen Membran (M) verankert. Das einfachste Modell, der Uniporter, transportiert einen Stoff entlang eines Konzentrationsgradienten (erleichterte Diffusion, siehe Abschnitt 1.3.2.2). Werden zwei Stoffe gleichzeitig durch eine Membran transportiert, bezeichnet man dies als Kotransport. Der gekoppelte Transport kann dabei in die gleiche Richtung (Symport, zwei unterschiedliche Moleküle werden in dieselbe Richtung transportiert) oder entgegengesetzt (Antiport, ein Molekül wird gegen ein anderes Molekül aus der Gegenrichtung getauscht) erfolgen (nach Löffler et al., 2007, verändert)

Ein wesentliches Merkmal aller Transporter ist deren Substratspezifität (Löffler et al., 2007). Diese bezieht sich entweder auf eine Struktureigenschaft für bestimmte Substrate (wie im Falle des Glucosetransporters (GLUT1), transportiert Glucose, sowie andere Hexosen und Pentosen) oder aber auf ein ganzes Set von Molekülen mit bestimmten Grundeigenschaften (wie z.B. beim Efflux-Transporter, dem P-Glykoprotein, der kleine, moderat hydrophobe Stoffe mit positiven Domänen, jedoch völlig unterschiedlicher chemischer Struktur transportiert; Bain et al., 1997).

Die Transportmoleküle lassen sich weiterhin in zwei Untergruppen einteilen.

### 1.3.1.1 Kanalproteine

Die erste Untergruppe sind die Kanalproteine, die den zu transportierenden Stoff in Strömen reihenweise passieren lassen. Die Kanäle können dabei entweder dauerhaft geöffnet sein, wie im Falle des Aquaporins (H<sub>2</sub>O Transporter) oder aber transient geöffnet vorliegen. Die Steuerung des Kanalzustandes kann dabei ligand- oder spannungsabhängig geregelt sein.

### 1.3.1.2 Carrier

Die zweite Untergruppe sind sogenannte Carrier. Diese Proteine besitzen Bindestellen für ihre Transportsubstanzen (Liganden). Der Ligand geht eine vorübergehende Bindung mit dem Carrier ein und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung im Protein. Dadurch wird die Translokation des Liganden vermittelt.

Betrachtet man die Energetik des Transports über Transportmoleküle so findet man erneut eine Zweiteilung. Erfolgt der Transport entlang eines Konzentrationsgradienten so spricht man von passivem Transport (Diffusion, erleichterte Diffusion). Verschiedene Carrierproteine sind darüber hinaus jedoch in der Lage, Stoffe entgegen eines Gradienten zu transportieren (aktiver Transport, sogenannte Pumpen). Die nachfolgenden Abschnitte sind anhand des Energieverbrauchs der Transportprozesse eingeteilt.

## 1.3.2 Passiver Transport

Passiver Transport benötigt keine Energie in Form von ATP und findet immer entlang eines Konzentrationsgradienten statt. Bei dessen Verschwinden kommt der Transport gänzlich zum Stillstand.

### 1.3.2.1 Diffusion

Die einfachste Form des transmembranären Transports ist die Diffusion. Dieser Vorgang beruht auf dem physikalischen Prinzip, dass ein Stoff stets bestrebt ist, einen Gleichgewichtszustand zu erreichen (Ausgleich des Konzentrationsgradienten). Kleine amphiphile Moleküle (z.B. Ethanol) und hydrophobe Substanzen sind in der Lage, über die biologische Membran zu diffundieren, da sie in der Lipiddoppelschicht löslich sind. Sie werden somit gleichmäßig in den verschiedenen Kompartimenten verteilt. Diese Form des Transports benötigt kein Transportprotein, die chemischen Eigenschaften des zu transportierenden Stoffes sind dafür ausreichend.

Stoffe, die einen Einfluss auf die Zusammensetzung der biologischen Membran nehmen, können die Diffusion, sowie die später aufgeführten Transportprozesse, stören. Als Beispiel für einen solchen Stoff kann die natürlich vorkommende Salicylsäure genannt werden. Durch die Inkorporation der Säure in die hydrophobe Region der Doppelschicht wird die Fluidität der Membran drastisch erhöht. Daraus resultiert eine veränderte Transportrate über die Membran mit alterierten Eigenschaften (Balasubramanian et al., 1997). Ein Beispiel für einen Fremdstoff, der zur Störung der Membrandiffusion führt, konnte nicht gefunden werden.

### 1.3.2.2 Erleichterte Diffusion

Die erleichterte Diffusion über Tunnelproteine kann an Porinen oder sogenannten *gap junctions* (räumlich enge Verbindung zweier benachbarter Zellen, über das Tunnelprotein Connexin) stattfinden. Diese Vorgänge sind nicht selektiv für ein bestimmtes Molekül, sondern ermöglichen allgemein polaren und geladenen Molekülen den Durchtritt.

Solche *gap junctions* spielen eine wichtige Rolle beim Prozess des Hörens.

Ein direkt zugeordnetes Beispiel für Störungen bei Tunnelproteinen durch Fremdstoffe konnte im vorliegenden Rahmen nicht gefunden werden. Die Relevanz des Prozesses kann jedoch durch die Beschreibung der Folgen einer Mutation bei Connexingenen verdeutlicht werden: Erwiesenermaßen können Mutationen diverser Connexingene, also eine Beeinflussung der daraus entstehenden Tunnelproteine, zur Taubheit beim Menschen führen. Im Innenohr sind mindestens vier verschiedene Connexine identifiziert, die an einer Rezirkulation von Kalium-Ionen zwischen Haar- und Epithelzellen sowie der Endolymphe (lymphähnliche Flüssigkeit im Innenohr) beteiligt sind (Nickel und Forge, 2008; Zhao, et al., 2006; LeFebvre und Van De Water, 2000). Die Endolymphe ist mit ihrer definierten Kaliumkonzentration für die Funktion des Hörorgans und des Gleichgewichtsinnes nötig. Anhand einer Spannungsdifferenz zwischen der Endolymphe des Innenohres und der Perilymphe der Hörschnecke können die ankommenden Schallwellen in neuronale Reize umgewandelt und weitergeleitet werden. Kommt es zu Mutationen in den Connexingenen – und somit auch zu einer veränderten Kalium-Konzentration – hat dies Folgen. *„Mutationen dieser Gene verursachen etwa die Hälfte der congenitalen Taubheit. Eine in Südeuropa auftretende Mutation (GBJ2) des Connexin-26 Gens mit einer Trägerinzidenz von ca. 2 % verursacht eine häufige Form der sensorineuronalen Taubheit. Mutationen von Connexin-32 verursachen eine Form hereditärer Demyelinierungsneuropathie, der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung CMT1X“* (Löffler et al., 2007). Das heißt, dass die Veränderungen der *gap junctions* zur beobachteten angeborenen Taubheit führen.

### 1.3.3 Aktiver Transport

Erfolgt der Transport eines Moleküls entgegen seinem Konzentrationsgradienten, so wird dazu Energie benötigt und man spricht von aktivem Transport.

#### 1.3.3.1 Primär aktiver Transport

Aktiver Transport ist gekennzeichnet durch den Verbrauch von im Stoffwechsel generierter Energie. Wird bei einem Transport direkt, die bei der ATP Hydrolyse freiwerdende Energie für den Transport verwendet, so wird dieser Vorgang als „primär aktiver Transport“ bezeichnet. Moleküle, die direkt aus der Hydrolyse von ATP die Energie für endogener Vorgänge beziehen, werden allgemein als ATPasen bezeichnet (in diesem Fall: Transport-ATPasen) (Löffler et al., 2007, Rassow et al., 2006).

Aufgrund ihrer Mechanismen können vier unterschiedliche primär aktive Transportertypen benannt werden (F-Typ (siehe Beispiel), V-Typ (vakuoläre), P-Typ und ABC-Transporter (siehe Beispiel)).

### F-Typ Transporter

Es gibt die sogenannten F-Typ Pumpen (siehe Abbildung 1-7), welche beim Menschen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Sie stellen einen Multiproteinkomplex dar und besitzen einen zur Matrix gerichteten (F1) und einen membranären Anteil (F0). In der inneren Mitochondrienmembran verankert sitzt die Untereinheit a, welche als Protonenkanal tätig ist. Einige Vertreter dieser Familie können Protonen unter ATP Verbrauch über Membranen transportieren. Die meisten Vertreter der F-Typ Pumpen stellen jedoch eine Sonderform dar, da der Protonenfluss nicht durch ATP-Hydrolyse getrieben wird, sondern durch den Konzentrationsgradienten, welcher durch die Elektronentransportkette aufgebaut wird. Der Protonenrückstrom wird hierbei sogar zur Erzeugung von ATP genutzt. Diese „rückwärtslaufenden“ ATPasen werden als ATP-Synthasen bezeichnet (siehe Abschnitt 1.2.1).

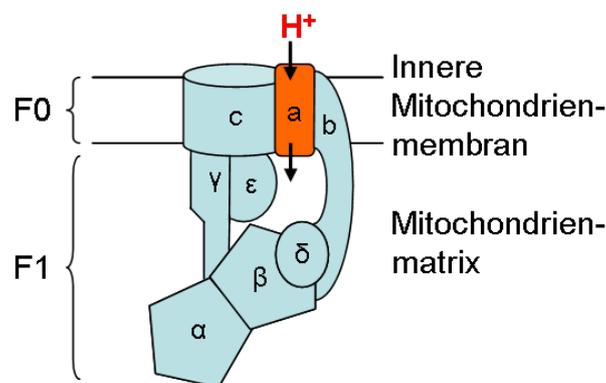


Abbildung 1-7: Aufbau der ATP-Synthase

Der aus 16 verschiedenen Untereinheiten (UE) aufgebaute Multiproteinkomplex der ATP-Synthase ist hier schematisch dargestellt. Die einzelnen Untereinheiten sind dabei vereinfachend jeweils nur einmal gezeigt. Die Untereinheit a, welche als Protonenkanal funktioniert, ist farblich hervorgehoben und der F0 bzw. der F1 Anteil sind gekennzeichnet (dem intermembranären F0-Anteil sind dabei die UE a bis c zugeordnet und der cytosolische F1-Anteil besteht aus den UE  $\alpha$  bis  $\epsilon$ ). (verändert nach Wang und Oster, 1998)

### **Beispiel: Hemmung einer F-Typ Pumpe durch Organozinnverbindungen (oSn)**

Es ist bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt, dass oSn die ATP-Synthase hemmen (Aldridge, 1958). oSn können durch die permeable, äußere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum gelangen. Dort treffen sie auf die ATP-Synthase. Deren Untereinheit a in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist und als Protonenkanal fungiert. Diese Funktion ist es, die diesen Proteinkomplex zu einem interessanten Beispiel macht. Forschungsergebnisse zeigen, dass oSn mit dieser Untereinheit a der ATP-Synthase nicht-kovalent assoziiert sind. Die Untereinheit a nimmt die protonenmotorische Kraft beim  $H^+$  Rückstrom auf und leitet sie mechanisch innerhalb des ATP-Synthasekomplexes weiter. oSn interagieren wie bereits erwähnt nicht-kovalent mit der Synthase, verschließen dabei deren Kanal und der Protonenfluss ist blockiert. Die Übertragung der Energie fällt aus und es wird kein ATP generiert (von

Ballmoos et al., 2008, siehe Abbildung 1-8). Die Inhibition beruht also auf der Blockade eines Carrierproteins.

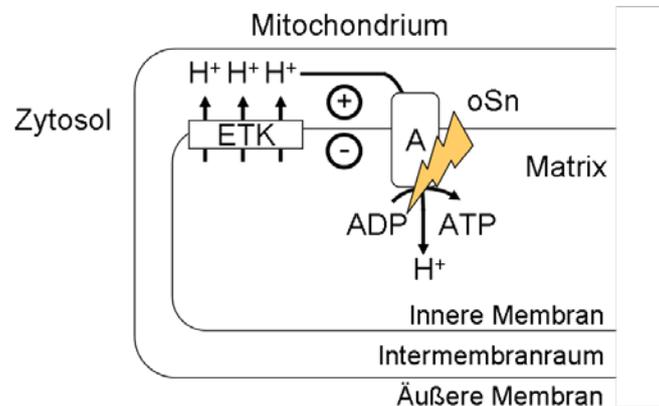


Abbildung 1-8: Hemmung der ATP-Synthase durch Organozinnverbindungen (oSn)

### ABC-Transporter

ABC-Transporter (ATP binding cassette) wurden zuerst in Bakterien gefunden, hier sind sie Transporter für diverse Zucker, Aminosäuren oder kleine Proteine. Diese Art des Transports kommt phylogenetisch ubiquitär vor (Jones und George, 2004). Der erste Transporter dieser Familie, der beim Menschen identifiziert wurde, besitzt gleichzeitig große physiologische Bedeutung - das P-Glykoprotein (auch MDR1, multidrug resistance). Das P-Glykoprotein ist eine Efflux-Pumpe, die unter physiologischen Bedingungen in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Leber und der Niere exprimiert wird, um endogene Abfallprodukte und Fremdstoffe aus den Zellen zu transportieren und über den Urin und die Galle ausscheiden zu können (Ambudkar et al., 2003). Tumorzellen, welche dieses Protein exprimieren, sind nicht empfänglich für Chemotherapeutika, da diese sofort aus den Zellen transportiert werden und der cytostatische Effekt nicht zum Tragen kommen kann (Litman et al., 2001).

### **Beispiel: Hemmung eines ABC-Transporters durch Nitromoschusverbindungen und polyzyklische Moschusverbindungen**

Wie bereits erwähnt, ist die Spezifität des P-Glykoprotein gegenüber einer Vielzahl an Substraten vorhanden (Bain et al., 1997), wodurch selbst gegenüber „neuen“, unbekanntem Umweltchemikalien ein gewisser Schutz geboten ist. Allerdings birgt diese Eigenschaft auch die Gefahr, dass beim Vorhandensein mehrerer möglicher Substrate, die Kapazität des Transporters schnell erschöpft ist. Ist dies der Fall, so spricht man von der sogenannten Chemosensibilisierung. Stoffe, die in der Lage sind, die Efflux-Transporter abzusättigen, sind sogenannte Chemosensitizer (Kurelec, 1997; Smital und Kurelec, 1998). Positiv ist dies bei der Behandlung von speziellen Tumorzellen, die empfänglicher für die Wirkung von Zytostatika sind (Luckenbach und Epel, 2005; Tsakura et al., 2007). Tritt diese Wirkung jedoch bei regulären Zellen auf, be-

wirkt sie die Anreicherung von Chemikalien, die ansonsten ohne einen (adversen) Effekt zu verursachen, ausgeschieden worden wären (Luckenbach und Epel, 2005).

Künstliche Nitromoschusverbindungen und polyzyklische Moschusverbindungen finden vielfach Verwendung als Geruchsstoffe. So findet man sie in Waschmitteln, Parfüms, Kosmetika und Seifen, aber ebenso in Geruchsstoffen für Lebensmittel und in Sprengstoff. Luckenbach et al. zeigten, dass diese Stoffe aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften eine Affinität zum P-Glykoprotein aufweisen und über diesen Mechanismus den Efflux-Transporter inhibieren und als Chemosensitizer auftreten (Luckenbach et al., 2004; Luckenbach und Epel, 2005).

### 1.3.3.2 Sekundär aktiver Transport

Im Gegensatz zum primär aktiven Transport wird beim „sekundär aktiven Transport“ die notwendige Energie für die Translokation aus der Nutzung eines Konzentrationsgradienten eines anderen Stoffes bezogen. Dieser Gradient wird jedoch unter Zuhilfenahme einer primär aktiven ATPase generiert. Deswegen ist auch dieser Transport indirekt von Stoffwechselenergie in Form von ATP abhängig.

Ein Beispiel für einen solchen Transporter ist der  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporter der Schilddrüse. Der  $\text{Na}^+$  Gradient wird von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase generiert (Bizhanova und Kopp, 2009). Durch den Transporter ist der Mensch in der Lage, in der Schilddrüse eine über hundertfache Jodidkonzentration innerhalb der Schilddrüsenzellen im Vergleich zum extrazellulären Raum aufzubauen (Wolff, 1998). Die Akkumulation von Jodid kann durch Perchlorat gestört werden ( $\text{ClO}_4^-$ ). Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  Symporters. Die nachgeschaltete Hormonbiosynthese, deren Grundbaustein Jodid dementsprechend fehlt, ist behindert (Wolff, 1998).

### Beispiel: Organselektivität aufgrund von Transportmolekülen – Lungentoxizität von Paraquat nach oraler Aufnahme

Das als Kontaktherbizid verwendete Paraquat zeigt eine sehr selektive Lungentoxizität nach oraler Aufnahme in den humanen Organismus. Dies wird durch die starke Expression eines bestimmten Transportmoleküls in den Alveolarzellen Typ I und II vermittelt (Boelsterli, 2007).

Der Transport ist energieabhängig und zudem sättigbar. Man schließt daraus, dass das für den Transport verantwortliche Protein ein Carrier ist. Der Transport kann durch physiologisch vorkommende Polyamine inhibiert werden, was die Vermutung nahe legt, dass der Transport von Paraquat durch den Polyamincarrier ausgeführt wird. Diese Vermutung wird weiterhin bestätigt durch die chemische Strukturähnlichkeit der Polyamine und des Paraquats (Boelsterli, 2007).

### Exkurs:

Der molekulare Mechanismus der Paraquat-vermittelten Toxizität kann nicht dem hier behandelten Thema Transport zugeordnet werden, soll aber trotzdem zur Vollständigkeit an dieser Stelle erläutert werden. Außerdem verdeutlicht dieser Exkurs, wie schwer die versuchte Zuordnung einzelner Fremdstoff-vermittelter Störungen zu definierten Prozessen im Organismus ist und zeigt auf, dass dies aufgrund der Kom-

plexität der Vorgänge oft nicht möglich ist. Zudem wird ein weiterer, nicht in unserer Ordnung gelisteter Mechanismus beschrieben - die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und der daraus resultierende oxidative Stress.

Die Lungentoxizität von Paraquat lässt sich folgendermaßen erklären. Paraquat wird nach oraler Aufnahme (nur in sehr geringen Mengen) resorbiert, es wird jedoch in der Leber nicht metabolisiert und verbleibt über Stunden im Blut. Es kommt zur Akkumulation in den Alveolarzellen vermittelt durch die dortige hohe Expression des Polyamincarriers (Hoet und Nemery, 2000).

Einmal im Zellinneren angelangt, wird das toxische Potenzial von Paraquat deutlich. Im sogenannten *Redoxcycling* fügt es den Zellen Schaden zu. Paraquat ist in der Lage, ein Elektron aus der Elektronentransportkette der Mitochondrien aufzunehmen, dadurch wird es zum Paraquat-Radikal. Das Radikal gibt sein überschüssiges Elektron an ein Sauerstoffmolekül ab, es entsteht Superoxid. Superoxide sind chemisch sehr reaktiv und zerstören ungesättigte Fettsäuren in den Mitochondrien- und Zellmembranen. Da das Kation durch Elektronen immer wieder zum Radikal reduziert wird, setzt sich dieser Vorgang bis zur völligen Zerstörung der Zellen fort (Foth, 1995).

Pathophysiologisch äußert sich der Effekt innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen, es kommt zur Ödembildung, zu einer Entzündung und schweren Blutungen. In einer zweiten Phase kommt es zur Ausbildung einer cystischen Fibrose, ausgelöst durch die versuchte Reparatur der geschädigten Alveolarzellen (Boelsterli, 2007)<sup>2</sup>.

#### 1.4 Chemische Signaltransduktion

Extrazelluläre Signalmoleküle beeinflussen unseren Organismus. Die Übertragung äußerer Signale auf die entsprechenden Effektormoleküle im Inneren einer Zelle wird als Signaltransduktion bezeichnet. In vielzelligen Organismen spielen chemische Signale eine große Rolle in der Koordination physiologischer Abläufe. Die Signaltransduktion findet in groben Zügen immer nach demselben Schema statt und kann als molekularer Schalt- oder Regelkreis betrachtet werden. Dieser kann auf verschiedenen Ebenen oder Stellglieder beeinflusst werden (siehe Abbildung 1-9). Im Folgenden wird dies anhand von Erläuterungen zu den einzelnen Stufen und Beispielen der durch Chemikalien bedingten Störungen verdeutlicht.

---

<sup>2</sup> Die pathophysiologischen Ereignisse an dieser Stelle könnten nun wiederum dem Thema Signaltransduktion und deren Störanfälligkeit zugeordnet werden. Wir beobachten erneut, dass eine grundlegende Störung nach Integration aller daraus resultierenden Ereignisse nur sehr schwer in eine Ordnung gepresst werden kann.

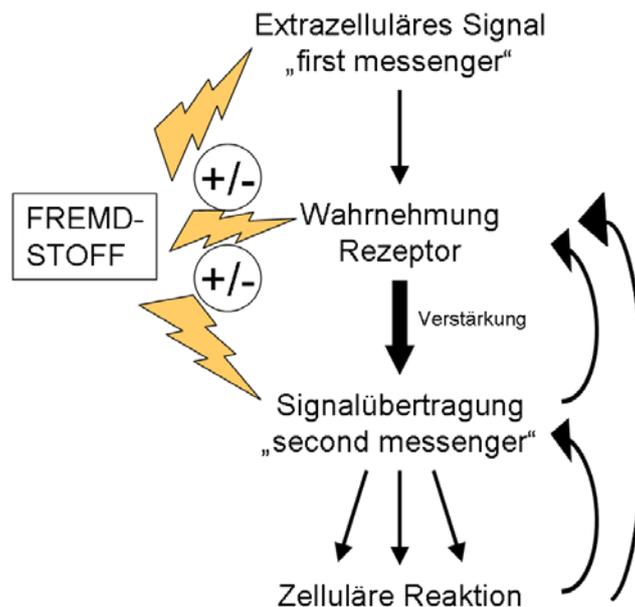


Abbildung 1-9: Prinzipien der Signaltransduktion (molekulare Schaltkreise) und daraus resultierende potentielle Angriffsebenen für Fremdstoffe (verändert nach Boelsterli, 2007 und Berg et al., 2007)

#### 1.4.1 Extrazelluläres Signal

Die chemische Kommunikation wird im menschlichen Organismus von Botenstoffen oder sogenannten „first messengers“ initiiert. Die wichtigsten Signalmoleküle stellen dabei Hormone, Cytokine und Neurotransmitter (zwei letztgenannten sind spezielle Unterordnung, siehe Abschnitt 1.4.1.2) dar (Löffler et al., 2007; Schwertz und Barry, 1994).

Die körpereigenen Signalmoleküle können nach Entstehungsort in glanduläre und aglanduläre (Gewebshormone) Hormone unterschieden werden.

##### 1.4.1.1 Glanduläre Hormone

Die meisten Hormone werden in endokrinen Drüsen (glandulär) gebildet und über das Blut zum entsprechenden Zielgewebe transportiert. Die wichtigsten humanen endokrinen Drüsen sind der Hypothalamus und die Hypophyse, die Schilddrüse, die Langerhans'schen Inseln des Pankreas, die Nebennieren und die Keimdrüsen.

Ein klassisches Beispiel für den Einfluss der Umwelt auf die Funktion von endokrinen Drüsen ist die thyroideale Dysfunktion bei Jodmangel. Wird die Schilddrüse nicht mit genügend Jod versorgt, findet die Hormonsynthese wegen des fehlenden Grundbausteins nicht regulär statt. Der hypothalamische-hypophysäre Regelkreis ist unterbrochen und führt z.B. zur Bildung eines Jodmangelstrumas (pathophysiologische Vergrößerung der Schilddrüse) (Löffler et al., 2007).

Glanduläre Hormone lassen sich bis auf wenige Ausnahmen nach chemischen Gesichtspunkten in drei Gruppen einteilen (Löffler et al., 2007).

- Erstens, hydrophilen Peptidhormone, die an membrangebundene Rezeptoren binden und dadurch zu einer Umstellung des intrazellulären Stoffwechsels führen (kurzfristige Regulation; z.B. Insulin, Glucagon).
- Zweitens, lipophilen Steroidhormone, die in der Lage sind, über die biologische Membran zu diffundieren. Sie binden intrazellulär an im Cytosol vorliegenden Rezeptoren und verändern dadurch die Genexpression (langfristige Regulation; z.B. Glucocorticoide: Cortisol).
- Als dritte Gruppe gibt es zahlreiche Aminosäurederivate (sind fast alle hydrophil, z.B. Katecholamine: Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin), die ebenfalls an der kurzfristigen Regulation von intrazellulären Prozessen beteiligt sind.

### **Beispiel: Störung der Aufnahme des extrazellulären Signals durch Organozinnverbindungen (oSn)**

Fremdstoffe können „first messenger“-Funktionen ausüben und durch die Beeinflussung der Ligand-Rezeptorkomplexbildung eine Störung verursachen. So verhält es sich etwa mit oSn<sup>3</sup>. Im vorliegenden Beispiel können die oSn zur Hemmung eines Transportproteins die Signaltransduktion beeinträchtigen. Sie binden an den intrazellulären Glucocorticoidrezeptor und verhindern dadurch sterisch die Interaktion mit den physiologischen Liganden, den steroidal Glucocorticoiden. Dies führt letztlich zur Veränderung allgemeiner Stoffwechselprozesse und zur Modulation der regulären Immunantwort (Gumy et al., 2008; vgl. auch Abschnitt 2.2.2).

#### **1.4.1.2 Aglanduläre Hormone**

Gewebshormone (oder aglanduläre Hormone) werden von einzelnen Zellen, die in den verschiedensten Geweben vorliegen, gebildet. Cytokine (dazu gehören Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine) sind lipophile Polypeptide und stellen die größte Gruppe innerhalb der Gewebshormone dar. Alle weiteren Gewebshormone sind keine Polypeptide und gliedern sich in die biogenen Amine (Histamin, Serotonin), Eikosanoide (Prostaglandine, Leukotriene), Gase (NO) und Neurotransmitter (Acetylcholin, GABA, Glutamat, Glycin) (Löffler et al., 2007).

### **Beispiel: Störung der Herstellung des „first messenger“ Stickstoffmonoxid durch Blei**

Als Teil der angeborenen Immunantwort produzieren Makrophagen unter anderem das Gewebshormon Stickstoffmonoxid (NO). Zusammen mit anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorischen Cytokinen bildet dies die erste Barriere gegen mikrobielle Pathogene (Sakai et al., 2006; Knight, 2000). NO wird in Makrophagen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) bereitgestellt. Durch Blei wird die Synthese dieser iNOS bereits auf mRNA-Ebene blockiert und folglich kein NO produziert (Kanematsu et al., 1996). Diese Hemmung der „first messenger“ Produkti-

---

<sup>3</sup> Diese Verbindungen wurden bereits im vorhergehenden Kapitel 1.3.3.1 zum Thema Transport diskutiert. Es zeigt sich an dieser Stelle erneut die Komplexität der Fremdstoff-vermittelten Effekte. Eine Umweltchemikalie kann unterschiedliche Wirkungsweisen bezüglich des menschlichen Organismus besitzen und beeinflusst letztlich diverse körpereigene Mechanismen.

on zieht eine veränderte biologische Reaktion nach sich (Tian und Lawrence, 1995; Hanafy et al., 2001)<sup>4</sup>.

### 1.4.2 Rezeptor

Hormone und Botenstoffe erreichen ihre Ziele nicht durch einen gerichteten Transport. Für die Selektivität ist allein die Rezeptorverteilung im Körper entscheidend. Die verschiedenen Rezeptortypen sind für die Signalaufnahme und intrazelluläre Weiterleitung verantwortlich. Es gibt nukleäre Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle und Membranrezeptoren (überwiegend Rezeptor- Tyrosinkinasen oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren) (Schwartz und Barry, 1994; Hill 1998; Löffler et al. 2007).

Die intrazellulär vorliegenden nukleären Rezeptoren, können nach Bindung des Liganden selbst die Signalweitergabe durchführen. Die gebildeten Komplexe wandern in den Zellkern und sind dort als negative oder positive Regulatoren der Transkription für bestimmte responsive Elemente tätig und kontrollieren deren Expression.

#### **Beispiel: Störung der Signaltransduktion durch Interaktion von TCDD mit einem Rezeptor**

Die Signalweitergabe kann wiederum durch eine beeinträchtigte Ligand-Rezeptorkomplexbildung gestört werden. Beispielhaft zu nennen ist hier die Transkriptionsinduktion der durch den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) kontrollierten Gene durch die Bindung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-1,4-dioxin (TCDD, „Dioxin“) an den AhR. Der molekulare Mechanismus dieser Wirkung von TCDD wird in Abschnitt 3.1 näher beschrieben.

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind von ihrer Natur her immer auch Membranproteine. Die Ligandbindung führt zu einer Änderung der Durchlässigkeit für bestimmte Ionen, meist  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  Ionen. Die Kanäle können sowohl durch extrazelluläre als auch durch intrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden. Extrazelluläre Liganden sind beispielsweise die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Acetylcholin (ACh). Intrazellulär wirksam sind Inositolphosphate. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Weitergabe von Signalen und sind deswegen an dieser Stelle erneut aufgeführt.<sup>5</sup>

#### **Beispiel: Störung der Signalweitergabe durch Lindan**

Ein Beispiel, an dem die pathophysiologische Relevanz der Veränderung eines solchen Kanals (membrangebundener Rezeptor) durch Umweltchemikalien verdeutlicht werden kann, ist Lindan ( $\gamma$ -Hexachlorcyclohexan). Im folgenden Abschnitt sowie in Abbildung 1-10A wird der Wirkmechanismus von Lindan sowie anderer Hexachlorcyclohexane skizziert.

---

<sup>4</sup> Erneut kann hier auf die komplexe Natur der Wirkmechanismen von Fremdstoffen aufmerksam gemacht werden. Blei übt des weiteren, wie im Kapitel 1.2.2 beschrieben, eine inhibitorische Wirkung auf Enzyme aus

<sup>5</sup> Man sieht deutlich, dass selbst die körpereigenen Mechanismen durch die Verzahnung von Funktionsweise und Funktion im biologischen System zu einer Erhöhung der Komplexität unserer Zuordnung führen.

Ein Neurotransmitter anregender (exzitatorischer) Neuronen ist Acetylcholin (ACh). Dieser bewirkt an der postsynaptischen Membran die Öffnung von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen und führt somit zur Weiterleitung des Signals (elektrische Signaltransduktion).

Physiologisch wird diese Signalweitergabe durch inhibitorische Neurone moduliert. GABA ist deren Neurotransmitter, welcher nach Freisetzung die Öffnung von Ligand-gesteuerten  $Cl^-$  Kanälen vermittelt und die Reizweiterleitung erschwert bzw. gänzlich unterbindet. Eine Übererregung ist demnach nicht möglich.

Lindan ist als GABA-Antagonist wirksam. Die Ligand-Rezeptorkomplexbildung ist dabei beeinträchtigt. Lindan bindet an die  $Cl^-$  Kanäle, bewirkt jedoch nicht deren Öffnung. Ankommende Signale werden unelektiert weitergegeben. Dies resultiert letztlich in einer Akkumulation der Signale und äußert sich in Spasmen (siehe Abbildung 1-10A, Stenersen, 2004).

Membranrezeptoren lösen nach der Aktivierung durch die extrazelluläre Ligandbindung eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Wie oben beschreiben kann der Rezeptor selbst ein Ionenkanal sein und der alterierte Ionenfluss übermittelt das externe Signal. In den meisten Fällen jedoch wird das Signal durch Phosphorylierung sequentieller Rezeptorproteine weitergeleitet. Oder aber die Signalweitergabe erfolgt durch die Aktivierung von sogenannten Rezeptor-assoziierten G-Proteinen. Solche G-Proteine liegen zunächst inaktiv vor (Guanosindiphosphat (GDP) gebunden). Bindet der transmembranäre Rezeptor seinen entsprechenden Liganden, kommt es intrazellulär am G-Protein zu einem Austausch von GDP zu Guanosintriphosphat (GTP, katalysiert durch mehrere Faktoren) - das G-Protein ist aktiviert. Dieses aktive G-Protein stimuliert bzw. inhibiert nachstehende Enzyme und moduliert so die intrazellulären Ereignisse.

Allgemein gilt bei Membranrezeptoren, dass das extrazelluläre Signal in eine intrazelluläre Reaktion überführt werden muss.

### 1.4.3 Signalweitergabe und zelluläre Reaktion

Die Umwandlung des externen Signals in ein intrazelluläres Signal ist ein sehr komplexer Prozess. Die Signalweitergabe erfordert meist die *de novo* Synthese oder Freisetzung von sogenannten „second messengers“ (z.B. cAMP, cGMP,  $Ca^{2+}$ , Inositolphosphate).

Durch verschiedene cytosolische Effektorproteine kann es zu einer Signalamplifikation kommen. Durch die Rekrutierung weiterer Effektor- und Adaptorproteine (z.B. unterschiedlicher Kinasen, Adenylylcyclasen) an Rezeptoren kann es zur Ausbildung einer regelrechten Signalplattform (komplexe Mikrodomänen mit einer Vielzahl an assoziierten Proteinen und Lipiden) kommen, in der sich verschiedene signalweiterleitende Systeme häufen und sich unter Umständen wechselseitig beeinflussen (Hill, 1998). Die Zelle muss durch Signalintegration aus der Vielzahl der auf sie treffenden Mediatoren die adäquate biologische Reaktion generieren. Diese enorme Komplexität der Signalübertragung ist Gegenstand aktueller Forschung (Cuevas, et al., 2007; Werlen und Palmer, 2002).

Die Aktivierung der Signalübertragung ist stark reguliert. Ebenso unterliegt die Beendigung der Weiterleitung festgelegten Mechanismen. Die Rezeptorexpression und -lokalisation spielt dabei eine Rolle. Das Vorhandensein von löslichen Rezeptoren im

extrazellulären Raum oder cytosolische Inhibitoren wirkt gleichermaßen negativ regulierend, ebenso wie diverse Rückkopplungsschleifen.

### **Beispiel: Hemmung der negativen Regulation des Signals durch Organophosphate und Carbamate**

Das Abschalten eines durch ACh-vermittelten Signals wird mittels Degradation des *second messengers* durch die postsynaptisch positionierte Acetylcholinesterase (AChE) geregelt (vgl. Abbildung 1-10B). Dieser Aspekt der Regulation kann durch Organophosphate (z.B. Parathion) oder Carbamate (z.B. Aldicarb) beeinflusst werden. In beiden Fällen ist die Substrat-Enzym-Komplexbildung gestört. Das physiologische Substrat Acetylcholin bindet an das Enzym, wird metabolisiert und hinterlässt ein funktionsfähiges Enzym. Die genannten Fremdstoffe sind antagonistisch wirksam, binden an das katalytische Zentrum des Enzyms und hinterlassen ein phosphoryliertes bzw. carbamoyliertes und so funktionsloses Enzym (Stenersen, 2004). Durch die anhaltende Funktionslosigkeit des Enzyms kommt es zu einem Anhalten des positiven Stimulus. Die pathophysiologische Konsequenz ist eine Überstimulation des zentralen Nervensystems (Leibson und Lifshitz, 2008).

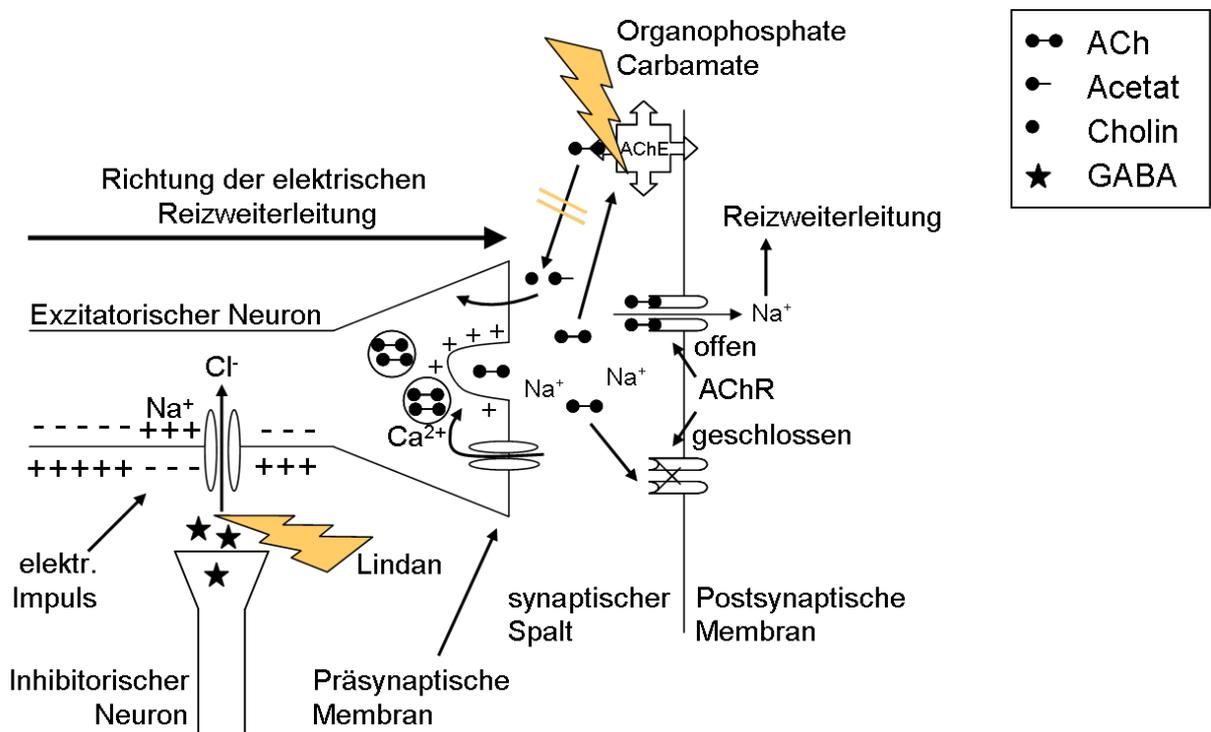


Abbildung 1-10 A/B: Schema neuronaler Signalübertragung

Dargestellt sind zwei voneinander unabhängige Vorgänge A und B innerhalb der neuronalen Signaltransduktion:

**A Lindan-vermittelte Störung der Bindung von Neurotransmittern an Rezeptoren.** Innerhalb eines Neurons kommt es zur elektrischen Reizweiterleitung (Aktionspotenzial, AP) ausgelöst durch einen transienten Na<sup>+</sup> Einstrom. Dieser anregende Impuls kann durch inhibitorische Neurone moduliert werden. Die Modulation der Na<sup>+</sup>-vermittelten Ladungsumkehr (AP) wird durch den Einstrom von Cl<sup>-</sup> Ionen durch entsprechende Kanäle geregelt. Die Öffnung dieser Kanäle ist von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA, Neurotransmitter) abhängig. Durch Lindan kann diese Ligand-vermittelte Öffnung antagonistisch blockiert werden. Die Folge ist eine Dauererregung der betroffenen Neuronen, da keine negative Regulation mehr stattfindet. Gelangt ein Aktionspotenzial bis an die präsynaptische Membran, werden Ca<sup>2+</sup> Kanäle geöffnet. Ca<sup>2+</sup> wirkt positiv regulierend auf die Migration der Acetylcholin(ACh)-haltigen Vesikel zur präsynaptischen Membran und deren Fusion. Der Neurotransmitter (ACh) liegt anschließend frei im synaptischen Spalt vor. Der ACh-Rezeptor (AChR) ist an der postsynaptischen Membran lokalisiert und im Ruhezustand geschlossen. Freies ACh bindet an den Rezeptor. Dieser ist nun durchlässig für Na<sup>+</sup> Ionen, die ebenfalls im synaptischen Spalt vorliegen und die Reizweiterleitung (Depolarisation) innerhalb des nachgeschalteten Neurons wird initiiert.

**B Carbamat- oder Organophosphat-vermittelte Störung der Deaktivierung von Neurotransmittern.** Die Exzitation wird über das, ebenfalls an der postsynaptischen Membran lokalisierte, Enzym ACh-Esterase (AChE) beendet. ACh wird durch AChE in Acetat und Cholin zerlegt und steht zur erneuten Aufnahme und Synthese des Neurotransmitters in der Präsynapse zur Verfügung. Organophosphate sowie Carbamate können die AChE-Aktivität hemmen. Die Folge ist wiederum eine Dauererregung, jedoch aufgrund der fehlenden Elimination des anregenden Neurotransmitters. (verändert nach Stenersen, 2004)

## 2 Erkennung „neuer“ toxischer Endpunkte bei Fremdstoffen über die Analyse von Toxizitätspfaden – Beispiele

### 2.1 2-Alkenale und Neurodegeneration

#### 2.1.1 Einleitung

Schätzungsweise 1,2 Millionen Menschen leiden in Deutschland an der Alzheimer-Krankheit (AK). Für das Jahr 2030 wird mit 2,3 Millionen Erkrankten gerechnet. Die Alzheimer-Krankheit ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit und nimmt den Erkrankten ihr Erinnerungsvermögen sowie ihre Fähigkeit zu denken und zu verstehen.

Über eine routinemäßige endpunktbezogene tierexperimentelle Testung ist es derzeit nicht möglich, einen fremdstoffbedingte Einfluss auf die Alzheimer-Krankheit zu erkennen. Vor diesem Hintergrund scheint es vorteilhaft, über (die derzeit noch beschränkten) Erkenntnisse zum Mechanismus der AK solche Stoffe gezielt zu testen, bei denen konkrete Anhaltspunkte für eine Beteiligung bei der Entstehung der Erkrankung vorliegen.

Bei 2-Alkenalen handelt es sich um solche chemische Substanzen, die nach dem derzeitigen Erkenntnisstand als Zwischenstufe zur Entstehung von AK beitragen und die Manifestation der Erkrankung beschleunigen können.

Beispiele für 2-Alkenale sind Propenal und Acrylamid (vgl. Abbildung 2-1), beide sind (auch) in der Umwelt zu finden (Beauchamp et al., 1985; Bisesi, 1994; Friedman, 2003; Morgan et al., 2000).

Die Moleküle enthalten eine elektronen-entziehende Gruppe (z.B. eine Carbonyl- oder Amid-Gruppe), die an ein Alken (Kohlenwasserstoffe mit mindestens einer Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen) gebunden ist. Stoffe mit einer solchen chemischen Struktur gehören zu den  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindungen (kurz 2-Alkenale).

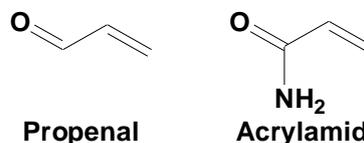


Abbildung 2-1: Molekularstruktur von Propenal und Acrylamid.

Bestimmte 2-Alkenale werden endogen gebildet (Abschnitt 2.1.2) und liegen in AK-Patienten in deutlich erhöhter Konzentration im Gehirn vor. Es bestehen mechanistische Erkenntnisse, auf welche Weise 2-Alkenale dazu beitragen, Nervenzellen zu zerstören. Die endpunktbezogenen Testbefunde zu nicht endogen gebildeten 2-Alkenalen, gegenüber denen jedoch als Umweltchemikalien eine Exposition bestehen kann, sprechen dafür, dass sie über den gleichen Mechanismus neurotoxisch wirken. Auf diesem Hintergrund besteht also Anlass, sich weitere 2-Alkenale dahingehend anzuschauen, ob diese

- ebenfalls über diesen Mechanismus wirken können, und
- als exogen aufgenommene Stoffe ebenfalls ins Gehirn gelangen können.

Dabei sind auch solche Stoffe einzuschließen, die über den Metabolismus in 2-Alkenale überführt werden.

### 2.1.2 Endogene 2-Alkenalbildung als Zwischenstufe bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Hypothesen zur Ursache der AK. Ein gemeinsamer Nenner der verschiedenen Theorien ist, dass oxidativer Stress eine Rolle in der Entwicklung und dem Verlauf der Krankheit spielt. Obwohl es nur 2% des Körpergewichts ausmacht, verbraucht das Gehirn 20% des im Körper verfügbaren Sauerstoffs. Im Gehirn findet sich eine Vielzahl von Antioxidantien, die die Bildung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kontrollieren bzw. verhindern. Bei der AK kommt es zu einer Akkumulation von Amyloid- $\beta$ -Peptiden ( $A\beta$ ), verursacht durch die erhöhte Produktion des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP oder dem unzureichenden Abbau von  $A\beta$ . *In vitro* konnte gezeigt werden, dass  $A\beta$  in Anwesenheit der Übergangsmetalle Kupfer oder Eisen toxische ROS generiert (Smith et al., 2007).

Auf dem Wege der Membran-Lipidperoxidation führt oxidativer Stress zur endogenen Produktion von 2-Alkenalen (vgl. Abbildung 2-2).

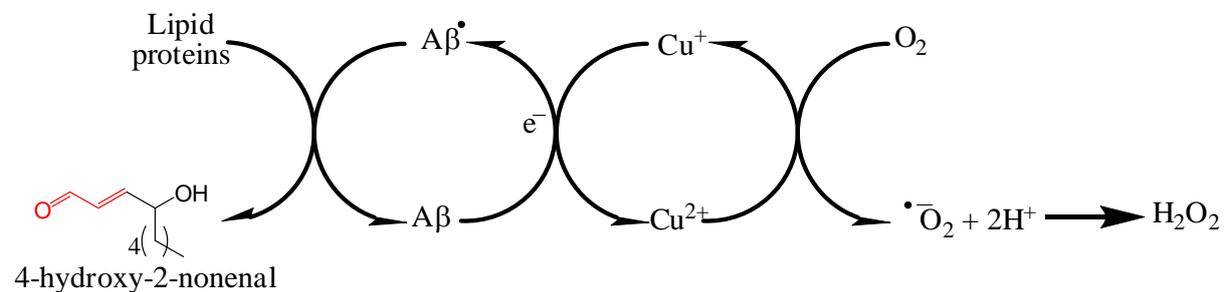


Abbildung 2-2: Endogene 2-Alkenalbildung

In der Reduktionsreaktion von  $Cu^{2+}$  Ionen und  $A\beta$  entstehen  $A\beta$ -Radikale ( $A\beta^\bullet$ ), die den umgebenden Lipiden und Proteinen Protonen entziehen. Dadurch entstehen 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) und andere Carbonyle.  $Cu^{2+}$  reagiert mit molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ), der letztendlich  $H_2O_2$  bildet.

### 2.1.3 Die Neurotoxizität von 2-Alkenalen

Zur Signalübertragung schüttet die präsynaptische Nervenendigung Neurotransmitter in den synaptischen Spalt, von wo aus dieser auf die signalempfangende, postsynaptische Nervenendigung einwirken. In einem gesunden Gehirn werden die Neurotransmitter nur dann ausgeschüttet, wenn dies erforderlich ist. Überschüssige Neurotransmitter werden wieder aufgenommen und in Vesikeln gespeichert.

Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch den Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. NO geht eine reversible Verbindung mit den Sulfhydrylgruppen der Synapsenproteine ein und reguliert dadurch deren Aktivität und die Signalübertra-

gungswege (Esplungues, 2002; Forman et al., 2004; Kiss, 2000; Stamer et al., 2001). Die Synapsenproteine sind für die Ausschüttung, Wiederaufnahme und Speicherung der Neurotransmitter verantwortlich. Abbildung 2-3A zeigt eine Nervenendigung und schematisiert die durch Sulfhydryl-NO-gesteuerten Vorgänge. 1. Speicherung von Neurotransmittern in Vesikeln; 2. Kalziumzufluss, der die Migration der Vesikel in Richtung präsynaptischer Membran steuert und die Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt bewirkt; 3. Aufnahme der Neurotransmitter an der postsynaptischen Membran; 4. Überschüssige Neurotransmitter werden an der präsynaptischen Membran wieder aufgenommen. Alle vier Vorgänge beruhen auf einer Pumpenfunktion, die durch die Bindung von Sulfhydrylgruppen und NO gesteuert wird.

Es wird nun angenommen, dass 2-Alkenale die Bindung von NO an die Proteine nachahmen und teilweise sogar eine ähnliche synaptische Signalübertragung auslösen. Im Gegensatz zu den NO-Bindungen ist die Bindung von 2-Alkenalen an die Proteine jedoch irreversibel und verhindert so wichtige Neuromodulationsvorgänge (siehe Abbildung 2-3B), was letztendlich zum Verfall der Neuronen führt (LoPachin et al., 2008). Abbildung 2-3B illustriert, wie 2-Alkenale die Aktivierung und Deaktivierung der jeweiligen Pumpenfunktionen im Neurotransmittertransport stören können.

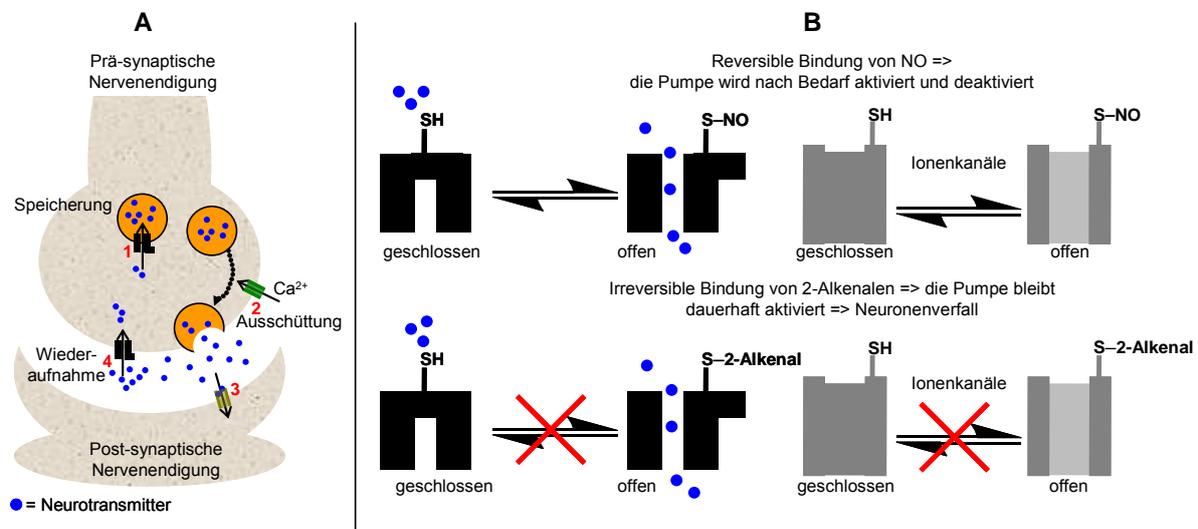


Abbildung 2-3: Schematische Ansicht des molekularen Mechanismus der Neurotoxizität von 2-Alkenalen

**A: Sulfhydryl-NO-gesteuerte Vorgänge im Neurotransmittertransport: 1. Speicherung der Neurotransmitter in Vesikeln; 2. Kalziumzufluss für die Migration der Vesikel zur präsynaptischen Membran; 3. Aufnahme der Neurotransmitter an der postsynaptischen Membran; 4. Wiederaufnahme überschüssiger Neurotransmitter.**

**B: Störung der Pumpenfunktionen durch 2-Alkenale. In schwarz sind die Neurotransmitter-Kanäle dargestellt, in grau betroffene Ionenkanäle (hier z.B.  $Ca^{2+}$ -Ionenkanal).**

Hintergrund für die in Abbildung 2-3 gezeigte Einwirkung der 2-Alkenale ist eine Wechselwirkung, bei der ein Nucleophil (Elektronendonator) auf ein Elektrophil (Elektronenakzeptor) trifft, wobei eine  $\pi$ -Bindung (eine Doppelbindung im Elektrophil)

in zwei neue, einzelne C-C-Bindungen umgewandelt wird. Die Analyse der Struktur und Funktion von Proteinen hat gezeigt, dass hauptsächlich nukleophile Sulfhydrylgruppen mit elektrophilen 2-Alkenalen interagieren und Addukte bilden (Barber und LoPachin, 2004; Doorn und Petersen, 2002; Hall et al., 1993; LoPachin und Barber, 2006; Nerland et al., 2003).

Die hier beschriebene Bindung von NO erfolgt in den meisten Organsystemen (Gaston, 1999; Hess et al., 2005). Da die Hirnzellen jedoch einen höheren Energiestoffwechsel haben, sind sie möglicherweise anfälliger für einen Angriff durch 2-Alkenale (Esplungues, 2002; Kiss, 2000). Schlussendlich hängt die Proteinadduktion nicht nur von den chemischen Eigenschaften des Elektrophils, sondern auch von der Mikroumgebung (den umgebenden Aminosäuren) der nukleophilen Sulfhydrylgruppe ab. Deshalb variiert die Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Zelltypen (Basile et al., 2008) und liegt die relative Affinität von 2-Alkenalen zu neuronalen Sulfhydrylgruppen nahe.

### 2.1.3.1 Humanstudien

Calingasan et al. (1999) veröffentlichten die erste Studie, die über Propenal als einen Faktor bei neuronalen Störungen und dem Absterben von Neuronen berichtete. Untersucht wurden dabei die Rolle von Propenal in der Protein-Modifikation und der Akkumulation von anomalen Filamenten und der mit der AK verbundenen Neurodegeneration.

Im Rahmen dieser Studie wurden 7 Patienten mit klinisch und neuropathologisch diagnostizierter AK sowie acht gesunde Individuen untersucht. Fünf der sieben AK-Patienten zeigten starke Propenal-Antikörper Immunreaktion. In der Kontrollgruppe konnte kein Propenal nachgewiesen werden (Calingasan et al., 1999).

Lovell et al. (2001) identifizierten und quantifizierten eine erhöhte Konzentration von endogen produziertem Propenal in den bei AK-Patienten typischerweise betroffenen Hirnregionen. Die Hirnproben für die Studie stammten aus den Autopsien von 10 AK-Patienten und 8 gesunden Individuen gleichen Alters. Der Propenalspiegel wurde durch Vergleich mit den Standardchromatogrammen ermittelt. In allen Hirnregionen konnten statistisch signifikante ( $p = 0.05$ ) Konzentrationserhöhungen (Proben der Amygdala: 2,5 nmol/mg Protein in AK-Patienten vs. 0,3 nmol/mg Protein in gesunden Individuen) festgestellt werden.

### 2.1.3.2 *In vitro* Untersuchungen

Um die Wirkung des endogen gebildeten 2-Alkenals Propenal auf Neuronen und deren Funktion zu untersuchen, wurden Neuronen aus dem Hippocampus steigender Propenal-Konzentration ausgesetzt. Entsprechend der im menschlichen Gehirn gemessenen Propenal-Werte wurden in der *in vitro* Untersuchung Konzentrationen zwischen 22 nmol/mg Protein (0,5  $\mu$ M) und 0,44  $\mu$ mol/mg Protein (10  $\mu$ M) verwendet. Die Tests zeigten, dass Propenal einen zeit- und konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellvitalität verursacht.

Propenal ist wesentlich toxischer als das ebenfalls endogen gebildete 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE; vgl. Abbildung 2-2): Eine Konzentration von 5  $\mu$ M Propenal führt in-

nerhalb von 12 Stunden zum Tod sämtlicher Neuronen, während die gleiche Menge HNE nach 24 Stunden nicht alle Zellen abgetötet hat (Lovell et al., 2001).

Mehrere Forschungsgruppen haben gezeigt, dass Propenal und HNE eine konzentrationsabhängige Hemmung der Ausschüttung, Wiederaufnahme und vesikulären Speicherung der Neurotransmitter verursachen. Die gleiche Wirkung hat auch der Umweltschadstoff Acrylamid (Castegna et al., 2004; Keller et al., 1997a,b; Lopachin et al., 2007; Lovell et al., 2001; Pocernich et al., 2001; Subramaniam et al., 1997).

Die Bindung der Sulfhydrylgruppen der synaptischen Proteine mit 2-Alkenalen über einen elektrophilen-nucleophilen Mechanismus konnte weiterhin durch spezielle Massenspektrogrammanalysen nachgewiesen werden (Barber und Lopachin, 2004; Lopachin, 2004). Weiterhin hemmen 2-Alkenale die für die Funktion elektrisch erregbarer Zellen besonders wichtige Kalzium-Pumpe (Keller et al., 1997a; Mark et al., 1997). Die Migration der Neurotransmitter-speichernden Vesikel innerhalb der Nervenendigung wird über den Zufluss von Kalzium in die Nervenendigung gesteuert, der durch die sogenannte Kalziumpumpe kontrolliert wird. Untersuchungen haben ergeben, dass sich 2-Alkenale irreversibel an die Sulfhydrylgruppe der Kalziumpumpe binden und deren Funktion und somit die Migration der Vesikel stören. Lovell et al. (2001) wiesen einen 3-fach erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel in Neuronen nach, die mit einer niedrigen Konzentration von nur 1 µM Propenal versetzt worden waren.

### 2.1.3.3 *In vivo* Untersuchungen

Endpunktbezogene Testungen mit Acrylamid erwiesen sich als kompatibel mit den oben dargestellten mechanistischen Vorstellungen:

Die US-amerikanische EPA gibt die orale Referenzdosis bei chronischer Acrylamid-Exposition mit 0,2 µg/kg x Tag an. Diese Referenzdosenabschätzung basiert auf neurotoxischen Befunden bei Ratten:

- teilweise reversible Axon- und Myelindegeneration mit einem subchronischen NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) von 0,2 mg/kg x Tag (Burek et al., 1980),
- verminderte Leistung im Rotarod-Bewegungstest nach subchronischer Exposition von Ratten gegenüber Acrylamid im Trinkwasser mit Dosierungen von 125 bzw. 200 mg/Liter bzw. 18 und 28 mg/kg x d. Histologische Untersuchungen zeigten morphologische Veränderungen und Myelindegeneration an Tibia- und Ischias-Nerven der Hochdosisgruppe (EPA, 1994),
- Degeneration der Nervenfasern in Ratten mit verminderter Reaktion des Streckmuskels am Hinterlauf und eine verringerte spontane motorische Aktivität nach subakuter Exposition gegenüber 10 und 20 mg/kg x d (nach der hohen Dosis auch noch 5 Wochen nach Versuchsende teilweise nicht reversibel; EPA, 1985).

Die in diesen Studien beobachteten Veränderungen und Degenerationen stimmen mit der bei der AK zu beobachtenden Neurodegeneration überein.

Obwohl der Großteil der Bevölkerung im Allgemeinen nicht solchen großen Dosen, wie sie in den oben genannten Experimenten verwendet wurden, ausgesetzt ist, untermauern die *in vivo* Untersuchungsergebnisse die grundsätzliche neurotoxische Wirk-

potenz von 2-Alkenalen. Dementsprechend besteht die Befürchtung, dass eine Akkumulation geringerer Dosen von manchen 2-Alkenalen die gesundheitsgefährdende Schwelle überschreiten kann.

#### 2.1.4 Können 2-Alkenale ins Gehirn gelangen?

Nicht in jedem Fall ist damit zu rechnen, dass bei äußerer Exposition gegenüber 2-Alkenalen diese auch systemisch aufgenommen und in das Gehirn eindringen können. Das Aldehyd Propenal besitzt z.B. eine besonders hohe Reaktivität und bildet daher leicht kovalente Produkte mit Proteinen. Aufgrund seiner hohen Reaktionsfähigkeit gelangt Propenal als Xenobiotikum nicht bis ins Gehirn, sondern reagiert bereits vorher im Körper und wirkt so hauptsächlich als ein Hepatoxin. Das im Gehirn von AK-Patienten feststellbare Propenal wird endogen durch die Interaktion von ROS und Lipiden produziert.

Im Folgenden geht es jedoch um 2-Alkenale, die „maskiert“ in das Gehirn eindringen können und erst dort zu einem reaktiven 2-Alkenal verstoffwechselt werden. Diese Eigenschaft besitzen möglicherweise die aus Furanen gebildeten 2-Alkenale. Furane werden enzymatisch zu einem 2-Alkenal verstoffwechselt (Burka et al., 1991; Parmar und Burka, 1993) (vgl. Abbildung 2-4).

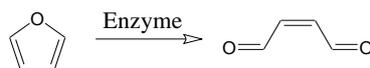


Abbildung 2-4: Furan wird zunächst zum Dialdehyd cis-2-Buten-1,4-dial oxidiert

Eine Hilfe zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit und der Möglichkeit, ins Gehirn vorzudringen, stellt „Lipinski's rule of 5“ dar. Diese 5er-Regel besagt, dass kleine, fettlösliche Xenobiotika, die nur wenige Donatoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen besitzen, mit größerer Wahrscheinlichkeit bioverfügbar sind. Der Name „5er-Regel“ rührt daher, dass alle ihre Zahlenwerte gleich oder ein geradzahliges Vielfaches von fünf sind: Eine Substanz hat dann eine gute Bioverfügbarkeit, wenn sie weniger als 5 Donatoren und nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen besitzt, ihre Molekülmasse nicht mehr als 500 g/mol beträgt und ihr Verteilungskoeffizient ( $\log P_{OW}$ ) zwischen Oktanol und Wasser zwischen -2 und +5 liegt.

Um sich vor dem Eindringen von Fremdstoffen aus der Blutbahn zu schützen, verfügt das Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke („blood-brain-barrier“, BBB). Die BBB ist ein Netzwerk von über 100 Milliarden Kapillargefäßen, das schädliche Substanzen aus dem Blutkreislauf davon abhält, in das Gehirn einzudringen. Lipinskis 5er-Regel kann auch unter anderem dazu verwendet werden, die Gehirngängigkeit (die Fähigkeit, die BBB zu passieren) von Xenobiotika zu bestimmen. Um die BBB zu durchdringen, müssen die Xenobiotika aber nicht nur Lipinskis 5er-Regel erfüllen, sondern im Regelfall auch neutral sein. Alle der in Abbildung 2-5, Abbildung 2-6 und Abbildung 2-8 aufgeführten Furane erfüllen Lipinskis 5er-Regel und sind neutral. Es ist daher anzunehmen, dass sie gut bioverfügbar sind und bis ins Gehirn transportiert werden können.

## 2.1.5 Furanmetaboliten als mögliche neurotoxische Substanzen

### Furfural und Furfuralderivate

Furfural wird aus verschiedenen Agrarnebenprodukten, wie z.B. Maiskolben, Hafer, Weizenkleie und Sägemehl gewonnen. Furfural und Furfuralderivate werden u.a. in der Herstellung von Kunstharzen und als Ausgangsstoff für Chemiefaserstoffe, in der Schmierölraffination, als Markierungsmittel für Heizöl, in der Herbizidproduktion oder auch als Geschmacksverstärker in Lebensmitteln eingesetzt. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA hat in mehreren *in vitro* und *in vivo* Experimenten Furfural und Furfuralderivate untersucht (EFSA, 2009).

Abbildung 2-5 zeigt Furfural und Furfuralderivate, die sowohl ein 2-Alkenal als auch eine Furangruppe, die *in vivo* zu einem 2-Alkenal verstoffwechselt werden kann, enthalten. Damit bieten diese Substanzen zwei Punkte für einen nukleophilen Angriff der neuronalen Sulfhydrylgruppen. Abbildung 2-5 illustriert die molekulare Struktur von Furfural und dessen Derivaten mit ihrer entsprechenden CAS-Nummer und systematischen Bezeichnung. Die bereits von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit untersuchten Substanzen sind zusätzlich mit der entsprechenden FL-Nummer (FLAVIS; EU Flavouring Information system) versehen.

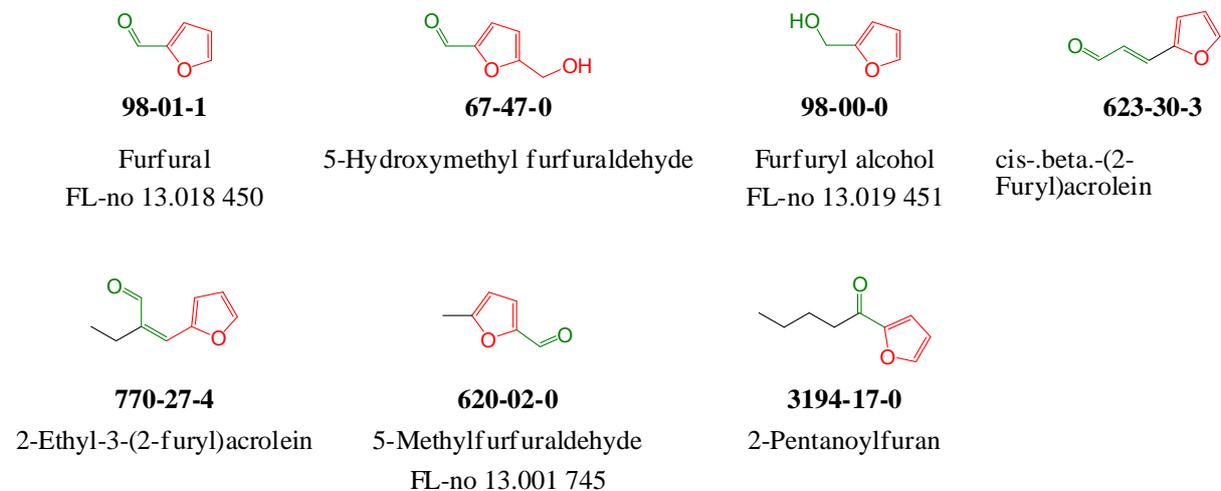


Abbildung 2-5: Furfural und Furfuralderivate, die ein 2-Alkenal (grün) sowie eine Furangruppe (rot) enthalten

## Furfural

2-Furaldehyd kommt als natürliches Produkt oder in Form einer Verunreinigung in vielen Lebensmitteln vor und wurde z.B. in Trinkwasser und Muttermilch nachgewiesen. Im Allgemeinen liegt die industrielle Belastung der Luft unter  $8 \text{ mg/m}^3$ . Es gibt nur begrenzte toxikokinetische Daten, die jedoch darauf hinweisen, dass 2-Furaldehyd leicht durch Einatmen und über die Haut aufgenommen wird. Die Aufnahme von 2-Furaldehyd in Form von Dampf über die Lungen und die Haut wurde am Menschen nachgewiesen. 2-Furaldehyd wird jedoch im menschlichen Körper zu 2-Furoglycin umgewandelt und zum Großteil mit dem Urin ausgeschieden. Obwohl über die toxische Wirkung von 2-Furaldehyd-Dampf auf das zentrale Nervensystem berichtet wurde, mindert die geringe Flüchtigkeit des Dampfes jedoch das Expositionsrisiko.

## Furfurylalkohol

Über 4 bis 16 Wochen hinweg wurden drei Monate alte, männliche Wistar Ratten intermittierend (6 Std. pro Tag an 5 Tagen pro Woche) Furfurylalkohol-Dampf mit Konzentrationen von 1 (25 ppm), 2 (50 ppm) oder  $4 \text{ } \mu\text{mol/Liter}$  (100 ppm) ausgesetzt.

Die Creatin-Kinase (CK) im Kleinhirn zeigte bei allen verabreichten Konzentrationen über das ganze Experiment hinweg eine erhöhte Aktivität, während die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität mit steigender Dosis sank. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Furfurylalkohol bereits nach sehr geringen Dampfkonzentrationen signifikante Auswirkungen auf die Mitochondrien im Gehirn hat, die zum Verfall von Gliazellen und zu Demyelinisation führen (Savolainen und Pfaffli, 1983). Diese Symptome stimmen mit den Krankheitszeichen der AK überein. Diese Untersuchungen müssen jedoch durch weitere Forschungen zur Relevanz der im hier vorliegenden Bericht angesprochenen Mechanismen untermauert werden.

Abbildung 2-6 zeigt Furfuralderivate, die nur eine verstoffwechselbare Furangruppe enthalten.

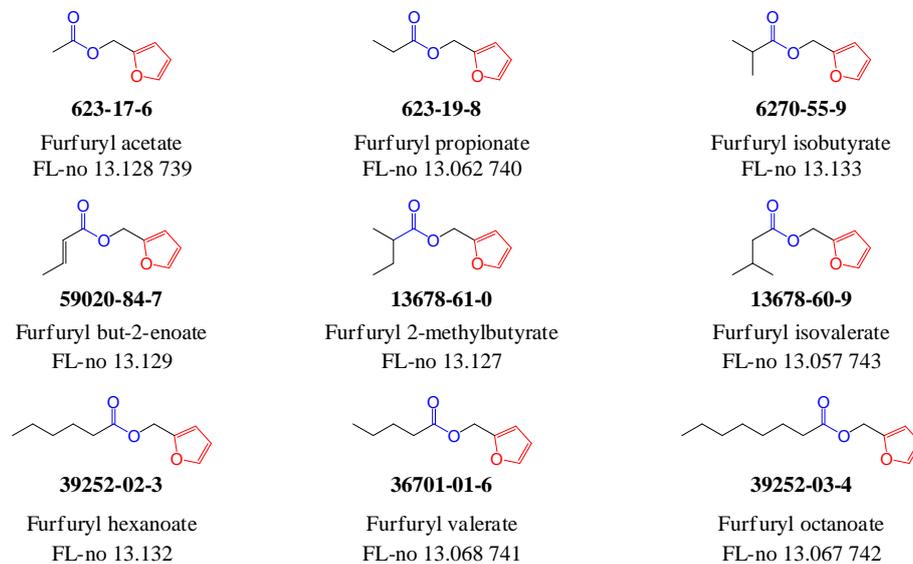


Abbildung 2-6: Furan-basierte Xenobiotika, die *in vivo* ihre Estergruppe (blau) leicht freisetzen können

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, sind Sulhydrylgruppen Nukleophile, die Elektrophile wie NO oder 2-Alkenale angreifen. Ohne genaue Versuchsdaten ist es nicht möglich vorherzusagen, ob Furfural und Furfuralderivate eine höhere oder geringere Affinität zu Sulhydrylgruppen haben als Propenal oder Acrylamid.

Bei den in Abbildung 2-6 aufgeführten Substanzen wurde die Hydroxylgruppe durch O-Furan als Alkoxygruppe (rot) ersetzt. Diese Substanzen können *in vivo* durch das Aufbrechen der Sauerstoff-Kohlenstoff-Verbindung zwischen der Furangruppe (rot) und der Estergruppe (blau) ihre Estergruppe freisetzen. Zurück bleibt Furfurylalkohol, der im Weiteren zu Furfural verstoffwechselt werden kann.

Aufgrund dessen sollte die gesundheitliche Wirkung durch diese Xenobiotika ebenso untersucht werden wie bei Furfurylalkohol und Furfural.

*In vivo* können Estergruppen leicht zu Carbonsäuregruppen umgewandelt werden. Wenn die Estergruppe „umgedreht“ und mit einer stärkeren C-C-Bindung an die Furangruppe gebunden ist (siehe Abbildung 2-7), verbleibt die Carbonsäuregruppe an der Furangruppe. Xenobiotika, die Carbonsäuren enthalten, können normalerweise nicht die BBB durchdringen, da die Carbonsäuregruppen leicht ihre Protonen freisetzen und somit eine negative Ladung erhalten. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass die in Abbildung 2-7 aufgeführten Substanzen in das Gehirn eindringen können. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA hat Furoesäure und deren Esterderivate untersucht. Aufgrund des geringen Gehirngängigkeitspotenzials kann die zu erwartende Neurotoxizität dieser Substanzen im Vergleich zu den Substanzen aus Abbildung 2-5 und Abbildung 2-6 als geringer eingeschätzt werden.

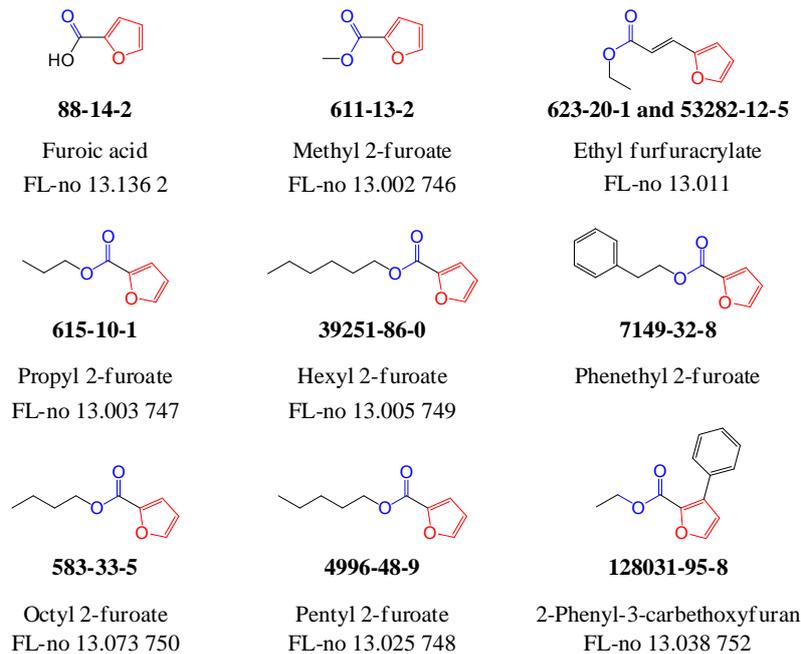


Abbildung 2-7: Furan-basierte Xenobiotika, deren Estergruppen (blau) als Carbonsäure *in vivo* an der Furangruppe verbleiben.

Furan-basierte Xenobiotika mit *einer* Elektronendonator-Gruppe haben eine schwächere elektrophile Ausprägung und sind deshalb weniger „begierig“, mit einem Nukleophil zu reagieren. Obwohl diese Xenobiotika (vgl. Abbildung 2-8) vermutlich eine geringfügig niedrigere neurotoxische Potenz haben, können sie doch ein Gesundheitsrisiko darstellen, da sie zu 2-Alkenalen verstoffwechselt werden können (ähnlich denen in Abbildung 2-5).

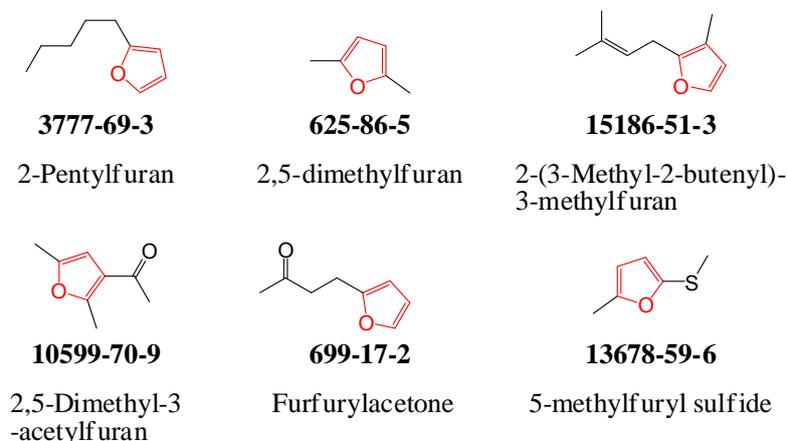


Abbildung 2-8: Furan-basierte Xenobiotika mit Elektronendonator-Methylgruppe

### 2.1.6 Mithilfe welcher Tests können neurotoxische 2-Alkenale identifiziert werden?

*Ex vivo* Experimente oder Messungen an lebendem Gewebe in einer künstlichen Umgebung (außerhalb des Organismus) erlauben die Untersuchung der enzymatischen Verstoffwechslung der aufgeführten Substanzen mit wesentlich geringeren Kosten und geringerem Zeitaufwand als mit *in vivo* Experimenten.

Der von Lovell et al. durchgeführte *ex vivo* Versuch zur Neurotoxizität von Propenal (Lovell et al., 2001; siehe Abschnitt 2.1.3.1 Humanstudien) eignet sich zur Identifikation von Furan-basierten Xenobiotika, die 2-Alkenale bilden.

Das *ex vivo* Experiment von Barber und LoPachin et al. bezieht sich an, um die Adduktbildung von Xenobiotika und Sulfhydrylgruppen zu untersuchen. Der Rückgang der Freisetzung von Neurotransmittern kann über die Inkubation von Synaptosomen mit den verschiedenen Xenobiotika getestet werden (Barber und LoPachin, 2004).

### 2.1.7 2-Alkenale und Myokardstörungen

Die im Abschnitt „*In vitro* Untersuchungen“ erläuterte Funktion der Kalziumpumpe spielt auch im Herz eine Rolle. Im Herz bindet sich das Kalzium, das in das Cytosol eindringt, an kontraktile Proteine und bewirkt so die Herzmuskelkontraktion. Der Herzmuskel entspannt sich, wenn das Kalzium das Cytosol wieder verlässt. Dieser konstante Zu- und Abfluss von Kalzium im Cytosol ist die Grundlage des Herzschlags.

Die Steuerung des Kalziumflusses im Herzen ist der in den Hirnneuronen sehr ähnlich. Deshalb können auch hier 2-Alkenale Addukte mit den Sulfhydrylgruppen der Kalziumpumpen bilden. Luo et al. haben belegt, dass eine einmalige Gabe von Propenal *in vivo* umgehend zu schwerwiegenden und zum Großteil irreversiblen Herzschiäden führt. Ihre Studien an isolierten Kardiomyozyten mit einer der klinisch nachgewiesenen Menge entsprechenden Propenal-Konzentration von 0,5 mg/kg zeigten eine herabgesetzte  $Ca^{2+}$ -Empfindlichkeit der Myofilamente (Luo et al., 2007).

Aus diesem Grund könnten die Xenobiotika aus Abbildung 2-5, Abbildung 2-6 und Abbildung 2-8 auf ihr Potenzial, Myokardstörungen zu verursachen, untersucht werden.

### 2.1.8 Zusammenfassung und empfohlene Schritte

In diesem Kapitel wurde die neurotoxische Wirkung von 2-Alkenalen vorgestellt. Die neuronale Schädigung kann durch die irreversible Bindung von elektrophilen 2-Alkenalen und nukleophilen Sulfhydrylgruppen ausgelöst werden. Zahlreiche Furan-basierte Substanzen, denen die Menschen im Alltag ausgesetzt sind, werden zu 2-Alkenalen metabolisiert. Es wird deshalb empfohlen, die in Abbildung 2-5, Abbildung 2-6 und Abbildung 2-8 aufgeführten Xenobiotika auf ihre Neurodegeneration auslösende Wirkung hin zu untersuchen. Selbst wenn die Belastung bei der breiten Bevölkerung das gesundheitsschädigende Maß nicht erreicht, so muss doch mit einer berufsbedingten Belastung über Hautkontakt und Inhalation gerechnet werden, deren Umfang den neurotoxischen Effekt zur Folge haben könnte (LoPachin et al., 2008). Eine gesundheitsschädigende berufsbedingte Belastung ist derzeit z.B. in der Pro-

duktion von Polyacrylamid ( aus Acrylamidpolymeren), das z.B. als Flockungshilfsmittel in der Abwassertechnik und als Retentionshilfsmittel in der Papierherstellung verwendet wird, nicht auszuschließen.

## 2.2 Xenobiotika und verzögerte allergische Reaktionen

### 2.2.1 Einleitung

Bei Exposition gegenüber bestimmten Pathogenen wird eine Immunreaktion ausgelöst, bei der Mediatorsubstanzen ausgeschüttet werden, die wiederum die Rekrutierung von Immunzellen verstärken. Das Ziel ist, den Körper vom eingedrungenen Pathogen zu befreien. Sobald das Pathogen beseitigt ist, wird die hormonelle Achse vom Hypothalamus über die Hypophyse bis zur Nebennierenrinde ( HPA oder Kortisolachse) aktiviert. Die HPA-Achse signalisiert, die pathogen-initiierte Entzündungsreaktion zu dämpfen und zur stabilen Homöostase zurückzukehren.

Je nachdem, auf welchem Mechanismus die allergische Reaktion beruht und wie schnell sie auftritt, wird zwischen verschiedenen Allergietypen unterschieden. Der vorliegende Bericht beschränkt sich auf die Allergie des Typs IV, die verzögerte allergische Reaktion. Verzögerte allergische Reaktionen treten typischerweise in der Lunge (als Asthma) und an der Haut (als Urtikaria und Ekzem) auf. Im Gegensatz zu den anderen Allergie-Typen ist die verzögerte Allergie nicht von Antikörpern abhängig, sondern zellvermittelt und wird hauptsächlich über das Steroidhormon Glucocorticoid ( GC) gesteuert. Glucocorticoide sind dabei auch Teil des immunregulatorischen Mechanismus. Sobald sie den Glucocorticoid-Rezeptor ( GC-Rezeptor) binden, wird die Immunreaktion gebremst (Vgl. Abbildung 2-9A).

Betrachtungsgegenstand ist eine Störung von glucocorticoid-gesteuerten Immunreaktionen, da dieser Endpunkt relevant ist.

Immun- bzw. Entzündungsreaktionen sind mit einem deutlichen Anstieg der Zytokin-Synthese verbunden. Zytokine signalisieren einerseits die vermehrte Rekrutierung von Immunzellen und aktivieren andererseits die HPA-Achse, woraufhin der systemische GC-Spiegel ansteigt. Dieser Mechanismus ist Teil der Feinabstimmung der Homöostase und verhindert überschießende, schädliche immunologische/entzündliche Effekte. Glucocorticoide unterdrücken sowohl die Zytokin-Genexpression als auch pleiotrope Effekte auf die Immunzellen. Sie wirken immunsuppressiv und anti-inflammatorisch und dämpfen überschießende Immunreaktionen ein (Brewer et al., 2003; DeKruyff et al., 1998).

Das Wissen über den Einfluss von Umweltchemikalien auf Prozesse, die von Steroidhormonen reguliert werden, die keine Sexualhormone sind, ist sehr begrenzt. Dazu zählen auch Glucocorticoid-gesteuerte Mechanismen. Hier besteht ein großer Bedarf an weiterführender Forschung, um die Wirkung von endokrinen Disruptoren auf die von GC-Rezeptoren regulierten Prozesse zu untersuchen. Der hier vorliegende Bericht konzentriert sich auf die Mechanismen, bei denen Xenobiotika die Funktion der GC-Rezeptoren und das Freisetzen von Zytokin Th1 stören. Eine solche Störung unterbricht den Signalstrom zwischen den GC-Rezeptoren und dem Hypothalamus, was bewirkt, dass die Entzündungsreaktion des Körpers anhält, obwohl das Pathogen beseitigt wurde (Sternberg, 2006).

Das vorliegende Kapitel erläutert, wie Fremdstoffe das Binden der Glucocorticoide an den GC-Rezeptor verhindern können. Die Ausgangshypothese ist dabei, dass Xenobiotika an der gleichen Stelle wie Glucocorticoide an den GC-Rezeptor binden, ohne jedoch eine biologische Antwort zu veranlassen (antagonistische Bindung) (Abbildung 2-9B). Kristallspektrografien und Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehung bilden die Basis für die Bestimmung der Strukturvoraussetzungen der Xenobiotika für deren Bindung an den GC-Rezeptor.

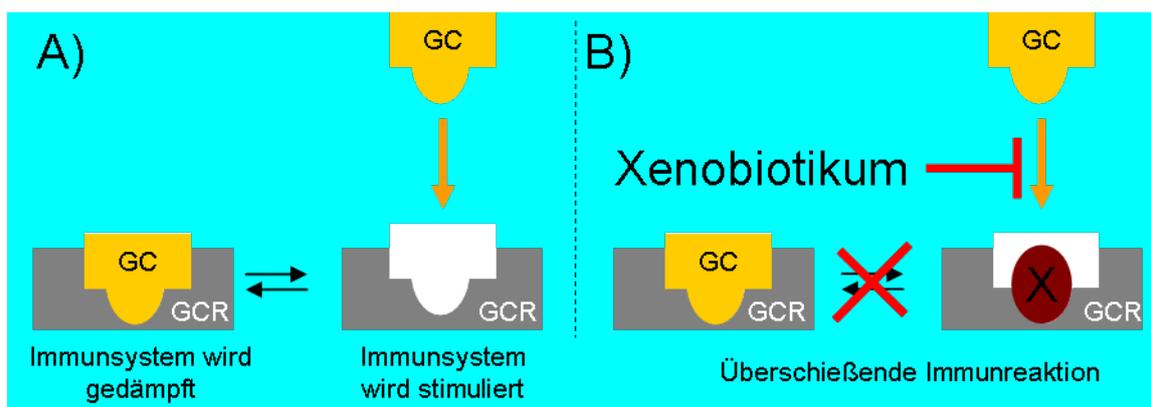


Abbildung 2-9: Schematische Ansicht von: A) dem natürlichen Wirkungsprozess der Bindung von Glucocorticoiden an den GC-Rezeptor; B) der Störung der GC-Bindung durch die antagonistische Bindung an derer Xenobiotika (X) an den GC-Rezeptor.

Ein etwas anderes geartetes Beispiel für eine Interaktion mit dem Glucocorticoid-Rezeptor stellen Organozinnverbindungen dar. Nähere Studien liegen von Gummy et al. vor. Die Autorengruppe untersuchte ganz spezifisch, ob Dibutylzinn (DBT) das Binden von Glucocorticoiden an den GC-Rezeptor inhibieren kann. Als Indikator für die Veränderung des Bindungsprozesses bestimmten sie, in welchem Maß DBT die Expression von GC-regulierten Enzymen und Proteinen verändert. Die Tests zeigten, dass DBT bereits in Konzentrationen von 3-300 nM (entspricht ca. den im menschlichen Blut nachgewiesenen Werten) eine toxische Wirkung auf die Immunzellen hat. Anhand von menschlichen Zellen stellten Gummy et al. fest, dass DBT mit den körpereigenen Glucocorticoiden konkurriert und durch die direkte Bindung an den GC-Rezeptor die Bindung der Glucocorticoide blockiert (Gummy et al., 2008; Odermatt und Gummy, 2008b; Odermatt et al., 2006).

Die genaue Bindungsstelle von DBT am GC-Rezeptor wurde bislang nicht kristallografisch oder durch andere Analysen bestimmt. Gummy et al. stellten jedoch eine erste Hypothese zur DBT-Bindungsstelle vor: basierend auf einer Computeranalyse argumentieren sie, dass DBT allosterisch an den GC-Rezeptor bindet. Diese allosterische Bindung verursacht eine kleine, aber entscheidende Strukturänderung der GC-Bindungsstelle, sodass Glucocorticoide den Rezeptor nicht mehr erkennen.

Da keine genaueren analytischen Daten für die exakte Bindungsstelle vorliegen, basieren die Angaben in diesem Bericht auf der Kristallspektroskopie solcher Substanzen, die an den GC-Rezeptor binden (z.B. Dexamethason, siehe auch Abbildung 2-9B). Hierdurch konnten zwei zentrale Kriterien für GC-Rezeptor-Liganden bestimmt werden:

1. um an den GC-Rezeptor zu binden, muss der entsprechende Stoff einen Steroid-A-Ring oder eine mimetische A-Ring-Gruppe besitzen (siehe auch „NSAID als glucocorticoide Isostere“);
2. um die immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung zu erzielen, muss der entsprechende Stoff ein agonistisches Reagens besitzen.

Es wird die Hypothese zugrunde gelegt, dass Xenobiotika, die zwar das 1., jedoch nicht das 2. Kriterium erfüllen, an den GC-Rezeptor binden können, aber dort nicht die anti-inflammatorische Immunantwort auslösen (antagonistische Wirkung).

### 2.2.2 Die Bindungsstelle der Glucocorticoide am GC-Rezeptor

Die molekulare Bindung der Glucocorticoide am GC-Rezeptor wurde mithilfe von Kristallspektrografie nachgewiesen. Abbildung 2-10 zeigt die Strukturen von Dexamethason (DEX; Bledsoe et al., 2002), Fluticasonfuroat (FF; Biggadike et al., 2008) und Deacylcortivazol (DAC; Suino-Powell et al., 2008), die alle drei Teil der GC-Familie sind. Die in Abbildung 2-10 gezeigten Steroidmoleküle haben zwei strukturelle Gemeinsamkeiten: sie besitzen eine A-Ring-Gruppe, die für die Erkennung des GC-Rezeptors nötig ist, und sie besitzen ein agonistisches Reagens, das den Rezeptor „aktiviert“.

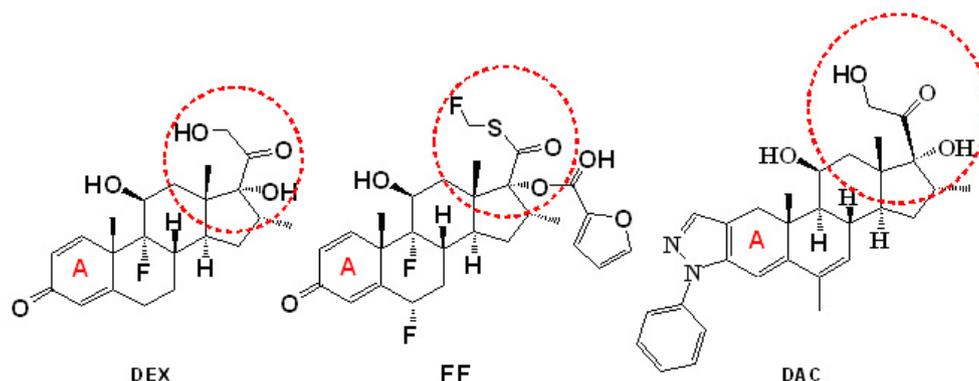


Abbildung 2-10: Die Strukturen von Dexamethason (DEX), Fluticasonfuroat (FF) und Deacylcortivazol (DAC). Der jeweilige Steroid-A-Ring ist mit einem roten A markiert, das agonistische Reagens mit einem roten, gestrichelten Kreis.

### 2.2.3 Bestimmung von weiteren Xenobiotika, die einen Steroid-A-Ring besitzen

Zur Bestimmung weiterer Xenobiotika, die an den GC-Rezeptor binden können, wurden Substanzen untersucht, die wie die Glucocorticoide einen Steroid-A-Ring besitzen. Xenobiotika, die diesen A-Ring aufweisen, aber nicht über das agonistische Reagens verfügen, haben einen antagonistischen Effekt, d. h., sie besetzen die GC-Bindungsstelle, ohne den Rezeptor zu aktivieren. Zwei solcher Antagonisten, Chloranil und Oxychinolin (siehe Abbildung 2-11), sind häufig in der menschlichen Umwelt anzutreffen.

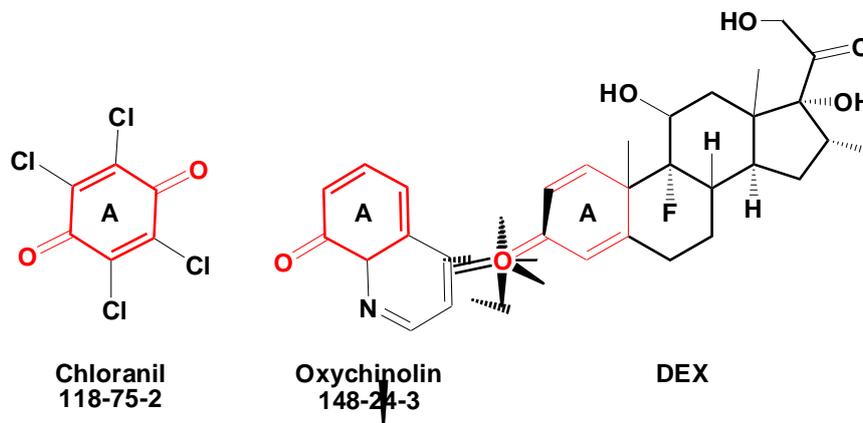


Abbildung 2-11: Die Strukturen von Chloranil, Oxichinolin und Dexamethason (DEX). Der Steroid-A-Ring ist jeweils rot markiert.

Chloranil wird als Fungizid und Getreideschutzmittel (mit zusätzlicher Wirkung als Insekten-Repellent und Bakterizid) eingesetzt und kann so direkt in die Umwelt gelangen. Durch die Produktion und den Einsatz von Chloranil als Farbstoff-Zwischenprodukt in der Herstellung von Elektroden zur pH-Wert-Messung oder auch als Reagenz kann es weiterhin über verschiedene Abfallströme in die Umwelt gelangen.

Durch die Produktion von Oxichinolin und dessen Verwendung als chemisches Zwischenprodukt in der Galvanik kann dieser Stoff über die verschiedenen Abfallströme in die Umwelt gelangen. Der frühere Einsatz von Oxichinolin als Fungizid kann ebenso zur Freisetzung in die Umwelt geführt haben. Der berufsbedingte Kontakt mit Oxichinolin kann über die Atemwege durch die Inhalation von Staub und durch Hautkontakt am Arbeitsplatz stattfinden. Das Auftreten allergischer Reaktionen wurde mit der Verwendung von Oxichinolin und ähnlichen Stoffen in Verbindung gebracht.

Chloranil und Oxichinolin wurden im Zusammenhang mit akuten Entzündungsherden in Ratten untersucht (Hay et al., 1997). Die Untersuchung bezog sich jedoch auf Veränderungen des IL-8-Spiegels, welcher nicht durch das GC-System reguliert wird. Der immuntoxische Effekt von Oxichinolin und Chloranil wurde des Weiteren in Knochenmarkstests an Mäusen und Ratten analysiert (Shelby et al., 1993). Keiner dieser Tests untersucht den Effekt von Oxichinolin und Chloranil auf das GC-System.

Aufgrund der strukturellen Nähe zum Steroid-A-Ring der Glucocorticoide sollte die GC-Wirksamkeit der beiden Stoffe untersucht werden.

### 2.2.4 NSAID als glucocorticoide Isostere

Die molekulare Bindung von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAID) an den GC-Rezeptor wurde mithilfe von Kristallspektrografie und Struktur-Wirkungs-Analysen untersucht. Im Rahmen des vorliegenden Berichts ist das in Abbildung 2-12 dargestellte nicht-steroidale GC-Isoster als NSAID-1 bezeichnet. NSAID, die an den GC-Rezeptor binden, enthalten typischerweise eine Pyrazol-Gruppe. Diese Gruppe ist ein valider Substituent des GC-typischen Steroid-A-Rings (siehe Abbildung 2-13) (Biggadike et al., 2007; Clackers et al., 2007; Madauss et al., 2008).

Die von Suino-Powell et al. durchgeführte SAR-Studie zeigte, dass ein mimetischer Steroid-A-Ring entscheidend für die Affinität eines Stoffes zum GC-Rezeptor ist. Pyrazol-Gruppen mit einem Phenylring wiesen darüber hinaus eine 10-fach höhere Affinität zum GC-Rezeptor auf als Pyrazol-Gruppen ohne Phenylring. Die N-Ethyl-Gruppe agiert dabei als „agonistisches Reagens“ (siehe Abbildung 2-10) (Barnett et al., 2009; Madauss et al., 2008). Die Kristallspektrografie von im GC-Rezeptor gebundenen Cortivazol (siehe Abbildung 2-12) zeigt, dass sich der Raum, der durch den Steroid-A-Ring im aktiven Zentrum eingenommen wird, weiten kann, um eine Arylpyrazol-Struktur aufzunehmen (Suino-Powell et al., 2008).

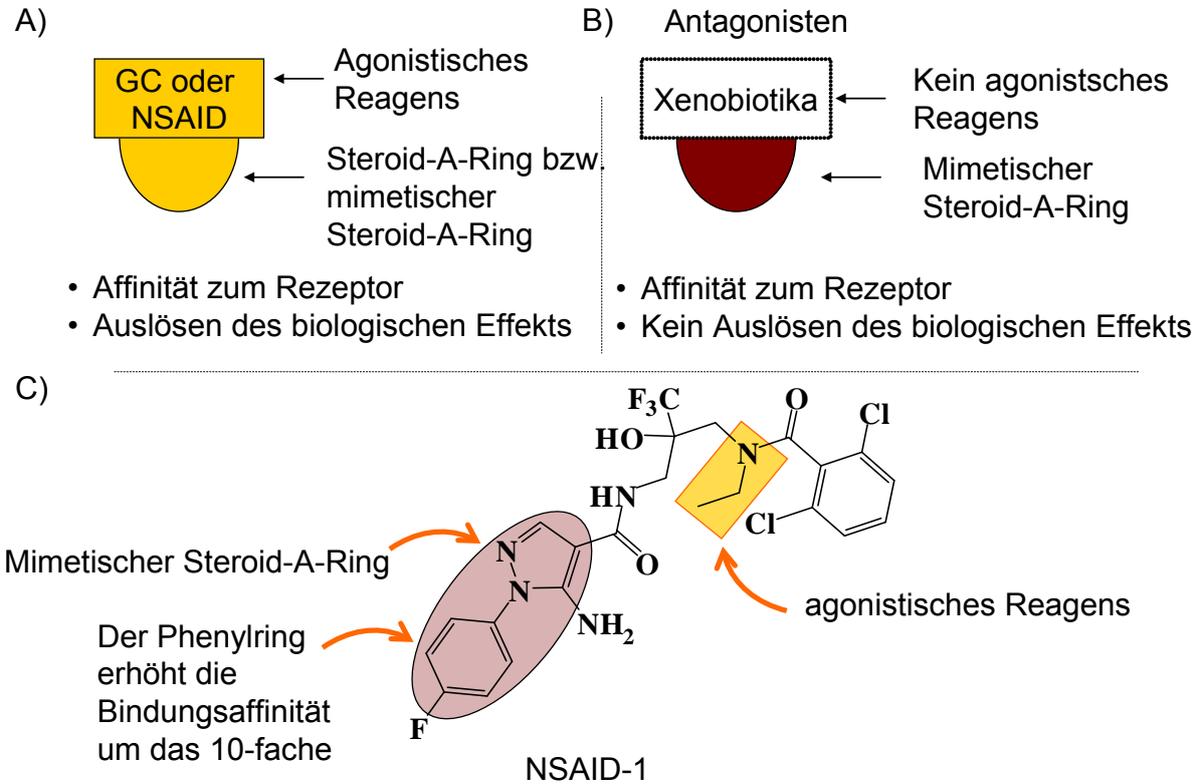


Abbildung 2-12: Struktur-Wirkungs-Beziehung von NSAID-1. Der Steroid-A-Ring und der Phenylring sind mit einem Kreis markiert.

### 2.2.5 Belastung mit Pyrazol-basierten Farbstoffen und deren toxische Wirkung

In einer Studie zur berufsbedingten Atemwegssensibilisierung bei Arbeitern aus der Textilindustrie wurde eine Gruppe von 135 Arbeitern einer Textilfärberei in Bezug auf das Auftreten akuter und chronischer Atemwegserkrankungen und Veränderungen der Lungenfunktion beobachtet (van Kampen et al., 2000). Die gewonnenen Daten deuteten darauf hin, dass Arbeiter in der Textilfärbereindustrie akute und chronische Atemwegserkrankungen als eine Folge ihres Kontakts mit den Farbstoffen entwickeln (Zuskin et al., 1997). Die Symptome der Arbeiter waren ähnlich den typischen Anzeichen einer verzögerten allergischen Reaktion. Obwohl Zuskin et al. nicht darauf eingehen, liegt die Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen und dem GC-Rezeptor nahe.

Der Phenyl-Pyrazol-Farbstoff Tartrazin (E102) ist ein gebräuchlicher Farbstoff, der in Lebensmitteln und Medikamenten eingesetzt wird (siehe Abbildung 2-13). Gleichzeitig ist Tartrazin der am häufigsten mit allergischen Reaktionen in Verbindung gebrachte Farbstoff. Bhatia et al. untersuchten Patienten, die eine allergische Reaktion bzw. Intoleranz gegen Tartrazin in psychotropischen Medikamenten entwickelt hatten. Von 2210 Patienten, die Tartrazin-haltige Medikamente erhielten, entwickelten 83 (3,8%) eine allergische Reaktion. Bei 13,2% dieser 83 Patienten war eine vorherige Tartrazin-Allergie bekannt und bei 15,7% war eine Überempfindlichkeit gegen Acetylsalicylsäure bekannt. Im Rahmen der Studie wurden die allergischen Patienten auf Tartrazin-freie Produkte umgestellt. In Übereinstimmung mit dem Verlauf einer verzögerten allergischen Reaktion klangen die Symptome der betroffenen Patienten innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Absetzen des Medikaments wieder ab. Es traten keine Allergien gegen die Tartrazin-freien Medikamente auf (Bhatia, 1996; Bhatia, 2000).

In einer klinischen Studie beobachteten Michaelsson und Juhlin, dass 35 von 39 Patienten mit rezidivierender Urtikaria (Nesselsucht) eine Überempfindlichkeitsreaktion auf Acetylsalicylsäure zeigten und 27 der 39 Patienten allergisch auf Tartrazin (aber auf keinen anderen Azofarbstoff) reagierten. Keiner der Patienten zeigte eine allergische Reaktion auf ein Placebo (Laktose). Die im Provokationstest verwendeten Tartrazin-Dosen werden im Alltag über den Genuss bzw. die Einnahme von Tartrazin-haltigen Lebensmitteln und Medikamenten schnell überschritten (Michaelsson und Juhlin, 1973).

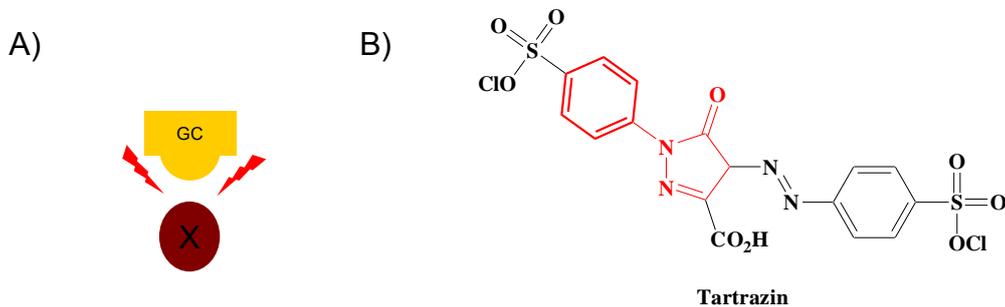


Abbildung 2-13: A) Schematische Ansicht der antagonistischen Bindung des Farbstoffs Tartrazin (X) an den GC-Rezeptor. B) Molekularstruktur von Tartrazin. Die mimetische A-Ring-Phenyl-Pyrazol-Gruppe ist in rot markiert.

Tartrazin besitzt eine Phenyl-Pyrazol-Gruppe, deren Struktur dem NSAID-1 aus Abbildung 2-12 sehr ähnlich ist. Kristallspektrografische Daten und SAR-Studien legen nahe, dass Tartrazin an den GC-Rezeptor bindet. Im Gegensatz zu NSAID-1 aktiviert Tartrazin jedoch nicht den Rezeptor, da das dafür nötige agonistische Reagens fehlt. Durch die antagonistische Bindung blockiert Tartrazin die Bindung der Glucocorticoide an den GC-Rezeptor, so dass das Immunsystem dauerhaft stimuliert bleibt.

Bei Tests für eine Allergie vom „Sofort-Typ“ wird das Blut auf einen erhöhten IgG, IgE und IgG4 Antikörper-Spiegel untersucht. Bei einer verzögerten allergischen Reaktion hingegen kann ein niedriger IgD-Antikörper-Spiegel beobachtet werden. Interessanterweise konnten bei einer grafischen Analyse die Patienten mit einer klinisch diagnostizierten Tartrazin-Allergie anhand ihrer IgD-, aber nicht ihrer IgE-Antikörper-Zusammensetzung von den Kontrollindividuen unterschieden werden (Weliky und Heiner, 1980; Weltmann et al., 1978).

### 2.2.6 Bestimmung weiterer NSAID-ähnlicher Xenobiotika

Fipronil wird als Desinfektionsmittel, Antiparasitikum und Pestizid eingesetzt und gelangt so direkt in die Umwelt. Es wirkt gegen Ektoparasiten und ist als Floh- und Zeckenmittel für Hunde und Katzen weit verbreitet („Spot-on“-Produkte). Auch die Produktion von Fipronil kann zu einem direkten Umweltkontakt durch die verschiedenen Abfallströme führen.

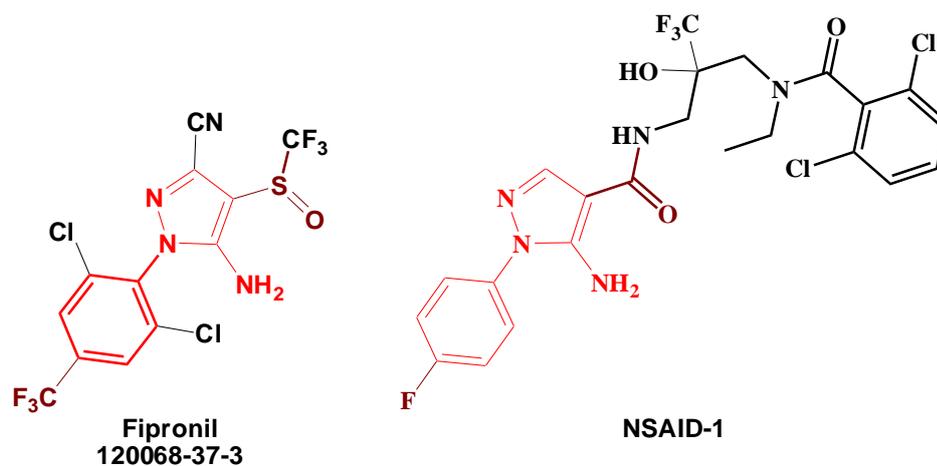


Abbildung 2-14: Fipronil weist eine signifikante strukturelle Ähnlichkeit mit NSAID-1 auf

Untersuchungen der kurz- und langfristigen toxischen Wirkung von Fipronil an Ratten, Katzen und Hunden lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Wie bei den Forschungsergebnissen von Seinen et al. zu Organozinnverbindungen (Seinen et al., 1977; Seinen und Willems, 1976), waren auch hier nur Ratten von der toxischen Wirkung von Fipronil betroffen. Aufgrund der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse bei den verschiedenen Spezies wurden die Effekte bei Fipronil als speziespezifisch und nicht gesundheitgefährdend für Menschen eingestuft (EFSA, 2006). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu NSAID-1 erscheint es jedoch plausibel, dass Fipronil an den GC-Rezeptor bindet (siehe Abbildung 2-14). Gemäß der hier vorgestellten Argumentation sollten die Ergebnisse der Tests an Ratten nicht unberücksichtigt bleiben und es sollte untersucht werden, ob Fipronil das GC-System stören kann.

### 2.2.7 Neonicotinoid-Insektizide

Die molekulare Zusammensetzung der als Neonicotinoide bezeichneten Insektizide legt nahe, dass diese eine weitere Klasse von NSAID-ähnlichen Antagonisten darstellen. Neonicotinoide rufen in Ratten Lethargie, Atmungsstörungen, verminderte Bewegung, schwankenden Gang, gelegentliches Zittern und Spasmen hervor. Einige dieser Symptome können durch die Störung des GC-Systems ausgelöst werden. Bislang wurden keine Vergiftungserscheinungen bei Menschen berichtet, entsprechende Symptome wären jedoch erwartungsgemäß denjenigen ähnlich, die bei Ratten gefunden werden.

Es gibt vier kommerziell eingesetzte Neonicotinoide, die den Kriterien für einen Antagonisten (mimetischer A-Ring und Fehlen des agonistischen Reagens) entsprechen: Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam und Clothianidin (siehe Abbildung 2-15). Die US-amerikanische Umweltschutzbehörde (U.S. EPA) hat Neonicotinoide als Toxine der Klasse II und III<sup>6</sup> eingestuft. Eine weitere Untersuchung des Potenzials, GC-

<sup>6</sup> Die EPA-Toxizitätsklasse II beinhaltet Xenobiotika mit einer moderaten Toxizität bei Aufnahme über die Haut oder durch Inhalation. Die EPA-Toxizitätsklasse III bezieht sich auf

vermittelte verzögerte allergische Reaktionen auszulösen, wäre auch deshalb angezeigt, weil insbesondere Asthmatiker und Personen mit einer Überempfindlichkeit gegen Acetylsalicylsäure und Tartrazin empfindlich auf GC-wirksame Stoffe reagieren.

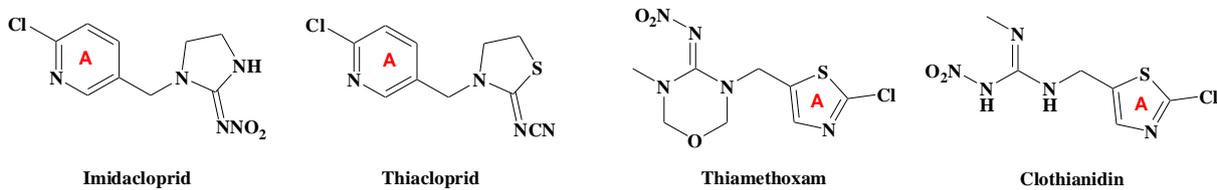


Abbildung 2-15: Liste der Neonicotinoide, deren GC-Wirksamkeit untersucht werden sollte

### 2.2.8 Geeignete Assays für die Bestimmung von GC-wirksamen Xenobiotika

Die folgenden drei Versuche können genutzt werden, um die GC-Wirksamkeit der im Bericht vorgestellten Xenobiotika zu untersuchen.

1. Assay mit menschlichen GC-Rezeptoren transient transfizierte HEK-293 Zellen. Dieser Versuch wurde zur Untersuchung des Effekts von Organozinn-Verbindungen auf die GC-Rezeptor-Funktion verwendet (Gumy et al., 2008).
2. Nuklearer GC-Rezeptor Translokations-Assay. Dieser zellbasierte Versuch wurde entwickelt, um die Identifizierung und Analyse von GC-Rezeptor-wirksamen Substanzen zu erleichtern und die Wirkung von Xenobiotika auf die verschiedenen Stufen der GC-Rezeptor-Prozesse zu bestimmen (Odermatt und Gumy, 2008a).
3. GC-Rezeptor-Antagonist Assay mit menschlichen Lungenepithelzellen. Dieser Versuch erlaubt die Untersuchung von Xenobiotika auf ihr Potenzial, bei der Dexamethason-induzierten Aktivierung als Antagonist zu wirken (Barker et al., 2006; Clackers et al., 2007).

### 2.2.9 Diskussion

Vieles weist darauf hin, dass Menschen einer Vielzahl von potenziell GC-wirksamen Umweltschadstoffen ausgesetzt sind. Im Kapitel 2.2 wurden sowohl toxikologische als auch Untersuchungen aus der Arzneimittelforschung einbezogen, um GC-wirksame Substanzen zu identifizieren. Das GC-System ist sehr empfindlich gegenüber Störungen. Toxikologische Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits geringe Mengen von Organozinn-Verbindungen beeinträchtigend wirken.

---

Xenobiotika, die gering toxisch sind und bei Aufnahme Irritationen der Haut, Augen, Nase oder des Rachens auslösen können.

Ob die im vorliegenden Bericht vorgestellten Xenobiotika jedoch ebenso gesundheitsgefährdend sind wie Organozinn-Verbindungen, hängt von den folgenden zwei Faktoren ab:

1. Lipophile Organozinn-Moleküle sammeln sich in der Nähe der Lipid-Wasser-Grenzschicht von Zellmembranen. Dadurch erreichen die Organozinn-Verbindungen eine wesentlich höhere Konzentration im Gewebe als im Blut, insbesondere in Geweben mit hohem Lipidgehalt. Wenn die hier vorgestellten Xenobiotika sich nicht an der Lipid-Wasser-Grenzschicht sammeln, ist es möglich, dass sie sich nicht zu einer schädlichen Konzentration anreichern können und entsprechend keine toxischen Effekte auslösen.
2. Weiterhin wurden synthetisch hergestellte Wirkstoffe wie Dexamethason und NSAID-1 nicht nur darauf ausgelegt, den GC-Rezeptor zu erkennen und zu aktivieren, sondern auch, ihr Ziel als intakte Moleküle zu erreichen.

Die Toxizität der vorgestellten Xenobiotika hängt deshalb davon ab, ob diese Moleküle intakt das Ziel erreichen, sich dort ansammeln und sich an den GC-Rezeptor binden. Diese Punkte müssen geprüft werden, um das Risikopotenzial der vorgestellten Xenobiotika bewerten zu können.

### **2.2.10 Empfohlene Schritte**

Die aufschlussreichen *in vitro*, *in vivo* sowie Humanstudien lassen den Rückschluss zu, dass eine Vielzahl gebräuchlicher Xenobiotika das Glucocorticoid-System stören können. In diesem Kapitel wurden verschiedene Xenobiotika mit struktureller Ähnlichkeit zu den körpereigenen Glucocorticoiden bzw. NSAID-1 identifiziert. Die toxische Wirkung dieser Xenobiotika beruht auf deren Bindung an den GC-Rezeptor mit antagonistischem Effekt. Es wird deshalb empfohlen zu untersuchen, ob die in Abbildung 2-11, Abbildung 2-14, Abbildung 2-15 dargestellten Xenobiotika verzögerte allergische Reaktionen hervorrufen können. Darüber hinaus sollte auch erforscht werden, ob sie den GC-Rezeptor intakt erreichen und ob sie sich an der Lipid-Wasser-Grenzschicht akkumulieren.

## **2.3 Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltschadstoffen im Alter**

### **2.3.1 Das Endoplasmatische Retikulum als „Werkzeug der Qualitätssicherung“**

Änderungen in der Konformation, Akkumulation und Aggregation von Proteinen kennzeichnen verschiedene alterstypische Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson und die Huntington'sche Krankheit (Selkoe, 2003). Die toxisch wirkende Akkumulation von Proteinen mit einer von der Normalität abweichender Faltung wird weitgehend auf eine zunehmende Ineffektivität des Chaperonsystems zurückgeführt (Macario und Conway de Macario, 2002). Dass Proteinaggregate üblicherweise in Zellen ohne Stresseinfluss nicht akkumulieren, wird zumindest teilweise mit der Existenz einer zellulären „Qualitätssicherungsmaschinerie“ erklärt.

Ein wesentliches Werkzeug der Qualitätssicherungskontrolle stellt das Endoplasmatische Retikulum (ER) dar. Das ER enthält molekulare Chaperone und Enzyme, die die Proteinfaltung kontrollieren, welche zusammengefasst als ER Chaperone bezeichnet werden. Diese sind verantwortlich für die korrekte Faltung von Proteinen, bevor diese in den Golgi-Apparat transportiert und sezerniert werden.

Hydrophobe Reste der Aminosäuren einer Proteinkette weisen üblicherweise in das Innere des gefalteten Proteins (lipophiler Bereich). Bei fehlerhafter Proteinfaltung können diese hydrophoben Bereiche in exponierte Positionen im wässrigen Zellmilieu gelangen. Zur Schaffung lipophiler Bereiche für diese hydrophoben Reste neigen derartig fehlgefaltete Proteine zur Aggregation. Diese Aggregate wirken so toxisch, dass sie apoptotischen Zelltod induzieren können (Yoshida, 2007).

Der Schutzmechanismus der Zelle gegen diesen Effekt besteht in der Rückhaltung von Proteinen mit anormaler Konformation im ER und einen Rücktransport in das Zytoplasma, was durch die sogenannte ER-assoziierte Degradation (ERAD) bewerkstelligt wird. Im Zytoplasma werden die fehlgefalteten Proteine durch Proteasomen (*Proteinasenkomplexe*) abgebaut. Der ERAD-Prozess kann in vier Schritte unterteilt werden: Erkennung, Rücktranslokation, Ubiquitinierung (post-translationale Modifikationen durch Ubiquitin als Markierung für den proteolytischen Abbau) und Abbau (Yoshida, 2007).

Als Hauptorganelle der Signaltransduktion wirken auf das ER permanent Steroide, Cholesterin und andere Signalmoleküle ein (Kaufmann, 1999; Lin und Boyce, 2005). Zusätzliche Stimuli, welche z.B. durch Stress der Zelle bewirkt werden, können die Zellen dazu veranlassen, derartige Mengen an Proteinen zu synthetisieren und zu sezernieren, dass die Kapazitätsgrenze der ERAD überschritten wird. Die Folge kann eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER sein.

Nachdem die korrekte Proteinfaltung ein essentieller Prozess der Zelle ist, besitzt das ER zusätzliche stressbedingte Schutzmechanismen. Diese sind Teil der Stressreaktion des ER oder des „unfolded protein response“ (UPR). Die Stressreaktion des ER von Säugierzellen umfasst 4 Mechanismen (Yoshida, 2007):

1. Verminderung der Proteinsynthese zur Vermeidung weiterer Akkumulation fehlgefalteter Proteine
2. Induktion der Transkription von Chaperongenen zur Erhöhung der Kapazität zur korrekten Faltung von Proteinen
3. Induktion der Transkription von ERAD-Komponenten zur Erhöhung der Kapazität der ERAD
4. Induktion von Apoptose, um durch Elimination von geschädigten Zellen das Überleben des Organismus zu sichern

### **2.3.2 Alterungsprozesse des Endoplasmatischen Retikulums**

Mit zunehmendem Alter wird eine Oxidation der Chaperone des ER beobachtet (Rabek et al., 2003). Oxidative Veränderungen der Chaperone resultieren wahrscheinlich in einer geringeren Effizienz der Erkennung und Prozessierung von Prote-

inen mit einer normaler Konformation. In der Folge wird das UPR-System über längere Zeiträume stimuliert, was zur Aktivierung von pro-Apoptosefaktoren wie dem CCAT/enhancer-bindenden Protein homologen Protein (CHOP) führt, welches Zellschädigung oder Zelltod bewirken kann (Angelopoulou et al., 2009; Wang und Takahashi, 2007; Zinszner et al., 1998).

Der Gehirnkortex älterer Mäuse weist erhöhte Spiegel an CHOP auf (Hussain und Ramaiah, 2007; Paz Gavilan et al., 2006). Bei erhöhten Konzentrationen dieses Proteins reagieren Zellen empfindlicher für oxidative Schädigungen (Ikeyama et al., 2003). In gentechnisch modifizierten Rattenfibroblasten, welche CHOP konstitutiv überexprimieren, wurden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies beobachtet (McCullough et al., 2001). Diese Effekte führen zu einer Zunahme anormaler Proteine in Zellen des alternden Gehirns.

Die UPR begrenzt den Proteingehalt der Zelle durch die Induktion der Bildung von Chaperonen wie dem „binding immunoglobulin Protein“ (BiP). BiP (welches auch als glukose-reguliertes Protein 78, Grp78 bezeichnet wird) ist ein glukosereguliertes molekulares Chaperon, welches die korrekte Proteinfaltung kontrolliert. Es ist ein zentraler Marker und Regulator der UPR. BiP hat unter den Chaperonen den Erstkontakt mit neu synthetisierten Peptiden, es bindet an deren hydrophobe Bereiche und verhindert während der Fertigstellung des Proteins eine Fehlfaltung. In gesunden Jungtieren steigen die Spiegel an BiP unter ER Stress an. Im Gegensatz hierzu verändert sich in alternden Tieren die Expression von BiP nicht in Abhängigkeit von der Stressbelastung der Zelle (Naidoo et al., 2008). Zudem ist die Expression des BiP im Normalfall in alten Tieren um 30% niedriger als in Jungtieren (Naidoo et al., 2008). Niedrige BiP-Spiegel bewirken also eine verminderte Kapazität des ER bei der Prozessierung neu entstehender oder fehlgefalteter Proteine.

Bei länger andauerndem Stress verändert sich die Aufgabe der UPR von einer lebenserhaltenden hin zu einer apoptotischen Funktion. Die zwei hauptsächlich beteiligten UPR-Rezeptoren sind hierbei Ire1 und PERK. Die Aktivierung dieser Rezeptoren stoppt die Zellteilung. PERK aktiviert sich durch Autophosphorylierung selbst, jedoch scheint diese Fähigkeit bei alternden Tieren verloren zu gehen (Naidoo et al., 2008).

Der ER-assoziierte Proteinabbau über Ubiquitinierung und Proteasomen ist einer von mehreren möglichen Mechanismen, mit denen eine mit ER-Stress und fehlgefalteten Proteinen konfrontierte Zelle ihren Proteingehalt reduzieren kann. Die hauptsächliche Funktion des Ubiquitins besteht in der Markierung von Proteinen zum Abbau in den Proteasomen. Ältere Tiere zeigen im Vergleich zu Jungtieren eine um den Faktor 4 höhere Ubiquitinierungsrate von Proteinen (Naidoo et al., 2008). Dies deutet auf einen höheren Gehalt an fehlgefalteten Proteinen und eine Sättigung des Ubiquitin-Proteasomen-Pfades in der Kortex des Mäusegehirns hin.

### 2.3.3 Veränderungen der Calcium-abhängigen Signaltransduktion

Calcium-abhängige Prozesse spielen eine wesentliche Rolle bei der Homöostase des ER, so benötigen z.B. ER Chaperone wie BiP zu ihrer Funktion  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Substanzen, die den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zelle stören, induzieren somit Stressbedingungen für das ER und können sogar Apoptose verursachen. Ein Anstieg der Calciumkonzentration während der Signaltransduktion wird sowohl durch eine Freisetzung im ER selbst als auch durch einen Einstrom über die Plasmamembran (Öffnung

von Ca-Kanälen) bewerkstelligt. Eine ATPase bewirkt einen aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Import und reguliert so den intrazellulären Ca-Pool, die Freisetzung erfolgt durch Aktivierung eines IP2-sensitiven Rezeptorkanals.

N-Methyl-D-aspartat-Rezeptoren (NMDAR) sind glutamatabhängige Ionenkanäle, welche bei der Regulation der synaptischen Funktionen des Gehirns eine zentrale Rolle spielen. Sie assoziieren im ER und bilden funktionale  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aus. Der Calcium-Influx über NMDAR aktiviert eine Ca-abhängige Signaltransduktion, welche mittels spezifischer Transkriptionsfaktoren für die synaptische Plastizität wichtig ist (Deisseroth et al., 1996; Lonze und Ginty, 2002). Einer der wesentlichen Transkriptionsfaktoren ist das „cyclic AMP-response element binding protein“ (CREB) (Hardingham und Bading, 2003). CREB bindet an regulatorische Sequenzen der DNA und verstärkt oder inhibiert die Transkription und somit auch die Expression verschiedener Gene. In Neuronen scheinen CREB Proteine an der Bildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt zu sein (Silva et al., 1998).

Die Ankunft eines Signals auf der Zelloberfläche aktiviert zuerst den NMDAR, über den „second messenger“  $\text{Ca}^{2+}$  wird eine Reihe von Proteinkinasen aktiviert. Drei Ca-abhängige Proteinkinasen sind bekannt (Lonze und Ginty, 2002):

1. Proteinkinase A (PKA)
2.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-abhängige Proteinkinase (CAMK)
3. Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)

Diese Kinasen aktivieren durch Phosphorylierung das CREB Protein. Letztlich spielt CREB eine wichtige Rolle bei der Signalleitung von Synapsen zum Zellkern, indem eine Verknüpfung der NMDAR-Aktivierung und der Ca-abhängigen Signaltransduktion mit der Expression von Genen erfolgt (Lonze und Ginty, 2002).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Lumen des ER liegt 3-4 Größenordnungen über der des Zytosols. Dieser Ionengradient wird durch Ca-ATPasen des Sarco/endoplasmatischen Retikulums (SERCA) aufrechterhalten. Diese Proteine transportieren  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol ins Organellenlumen. Aus diesem Grund könnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion ein vorgeschaltetes Ereignis der Wirkungen der UPR sein. BiP dient gleichermaßen als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und trägt so zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca-Homöostase bei. Caspersen und Mitarbeiter zeigten, dass ER-Stress, welcher sich in erhöhter mRNA Expression von BiP äußert, von einer Induktion von SERCA in der Zelle begleitet ist (Caspersen et al., 2000).

#### **2.3.4 Blei-induzierte Stresswirkungen im ER von Zellen des Nervensystems**

Blei ist für seine nervenschädigende Wirkung bekannt. Wegen seiner weiten Verbreitung in der Umwelt wird es als einer der bedeutendsten Umweltschadstoffe angesehen.

Nach systemischer Aufnahme gelangt Blei in die drei Kompartimente Blut, mineralische Gewebe (Knochen, Zähne) und Weichteile (z.B. Gehirn). Der Körper akkumuliert Blei über die gesamte Lebensdauer, so dass bei relativ geringer Ausscheidungsrate eine endogene Exposition über lange Zeiträume erfolgt. Die Halbwertszeit von Blei in Knochen beträgt beim Menschen mehrere Jahre bis Jahrzehnte (Schuetz et al., 1987). Besonders bei Schwangerschaft und Laktation, aber auch in anderen Be-

lastungssituationen mobilisiert der Körper Blei aus den körpereigenen Speichern (vor allem Knochen), was zu einem Anstieg der Blutbleikonzentrationen führt. Aus diesem Grund können sowohl vergangene als auch gegenwärtige Exposition zu erhöhten Risiken für toxische Effekte von Blei beitragen.

Während Transportsysteme für Blei ins Gehirn bekannt sind, gibt es keine Kenntnis über Mechanismen der Elimination aus diesem Organ (Qian, 2003). In zahlreichen Studien erwiesen sich Astrozyten als Hauptdepot für Blei im Zentralnervensystem (Zhang et al., 2008). Hohe Konzentrationen an Blei in Astrozyten sind die Ursache für eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER, was eine erhöhte Expression von molekularen Chaperonen zur Folge hat, während der Zellzyklus blockiert und die Transkription verschiedener Enzyme inhibiert wird. Zunehmend sprechen Daten dafür, dass einige der toxischen Wirkungen von Blei im ER lokalisiert sind (Qian, 2003).

Blei ist dafür bekannt, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zu stören. Akutexposition bewirkte eine spontane Zunahme des zytosmatischen Calciumspiegels. Mittels Kernspinresonanzspektroskopie und einem fluorierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator zeigten Dowd und Gupta (1991), dass eine Exposition von Thrombozyten gegenüber 1-25  $\mu\text{M}$  Blei *in vitro* den intrazellulären Calciumspiegel erhöht, wobei der Effekt mit der extrazellulären Bleikonzentration positiv korrelierte. Es wird vermutet, dass der bleiinduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx die Aktivierung zweier verschiedener Mechanismen bedingt: zum einen die Aktivierung der rezeptorgesteuerten Calciumkanäle und weiterhin ein potentialabhängiger Einstrom. Eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern verstärkt den Effekt des bleiinduzierten Anstiegs der intrazellulären Spiegel an freiem Calcium. In diesem Kontext wurde eine kompetitive Inhibition der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, ein Anstieg des Ausstroms von Calcium aus Mitochondrien und eine Zunahme der Mobilisierung von Calcium aus dem ER gezeigt (Verity, 1990). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Blei die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ATPase inhibiert (Fox et al., 1991; Viarengo et al., 1993). Weiterhin stimuliert Blei die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Depletion interner Calciumspeicher (Kerper und Hinkle, 1997a,b), beeinträchtigt das Auffüllen dieser Speicher (Wiemann et al., 1999) und bindet an das im ER lokalisierte BiP (Qian et al., 2000, 2001). Ein weiterer beobachteter Effekt ist die Induktion der Gen- und Proteinexpression von BiP in astrozytenähnlichen Rattengliomazellen durch Bleiexposition (Qian et al., 2000, 2001; Tully et al., 2000). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass Blei Veränderungen in der Expression von NMDAR-Untereinheiten verursacht, welche die CREB Phosphorylierung ändern (Toscano et al., 2003).

Eine Folge der durch Blei gestörten intrazellulären Calcium-Homöostase könnte der akute Calcium-vermittelte Zelltod sowie eine chronische Störung der neuronalen Differenzierung und Synaptogenese sein (Bradbury und Deane, 1993; Han et al., 1999).

### **2.3.5 Extrapolation: Induziert Nonylphenol bleiähnliche Stresswirkungen im ER?**

Alkylphenol-polyethoxylate (APEO) stellen die Hauptgruppe nichtionischer oberflächenaktiver Substanzen dar. Sie werden als Weichmacher in Kunststoffen wie Polyvinylchlorid und Polystyrol verwendet, welche bei der Nahrungsmittelverarbeitung und -verpackung zum Einsatz kommen (Inoue et al., 2001). APEO werden weiterhin in großem Umfang als Komponenten von Reinigungsmitteln und

Emulgatoren eingesetzt (Hawrelak et al., 1999). Die jährliche Produktionsmenge wurde 1988 weltweit auf 700000 Tonnen geschätzt (Jonkers et al., 2005). Alkylphenole werden als Zwischenprodukte bei der Herstellung von APEO hergestellt und sind in der Umwelt die Hauptabbauprodukte der APEO. 80% der produzierten APEO entfallen auf Nonylphenol-polyethoxylat. Aus diesem Grund wird das Abbauprodukt Nonylphenol (NP) als eine der wichtigsten Umweltkontaminanten angesehen (Gong et al., 2009).

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften wird NP gut von im Wasser lebenden Tieren, speziell Fischen aufgenommen und im Fettgewebe gespeichert (Coldham et al., 1998). Über die Nahrungskette gelangt es ins Ökosystem und stellt möglicherweise für Mensch und Tier ein Gesundheitsrisiko dar. Untersuchungen an gesunden Freiwilligen ergaben Belastungen von 0,2-0,3 ng NP/ml Plasma (Kawaguchi et al., 2004).

Trotz der weiten Verbreitung von NP in der Umwelt ist der Mechanismus seiner Toxizität noch nicht vollständig aufgeklärt. Am besten untersucht sind reproduktionstoxische Effekte bei Mensch und Tier. Mehrere Studien in Fischen und Nagern zeigten, dass NP die testikuläre Funktion beeinträchtigt, wobei Testesatrophien, strukturelle Veränderungen der Tests, verringerte Spiegel an zirkulierendem Testosteron und eine Suppression der Spermatogenese beobachtet wurden (Cardinali et al., 2004; Nagao et al., 2001; Tan et al., 2003; McClusky et al., 2007).

Die reproduktionstoxischen Eigenschaften von NP basieren auf seiner östrogenartigen Aktivität, wodurch NP als endokriner Disruptor wirkt. Östrogen beeinflusst liganden-abhängige Ionenkanäle wie Nikotin-Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Liu und Mitarbeiter zeigten, dass NP die nAChR partiell über eine Inhibition der  $Ca^{2+}$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung supprimiert (Liu et al., 2008). Es sind aber auch bereits seit 1990 einige nicht östrogenvermittelte Aktivitäten von NP bekannt (Michelangeli et al., 1990).

NP wirkt als  $Ca^{2+}$ -ATPase-Inhibitor im ER. In letzter Zeit untersuchten mehrere Forschergruppen die ER-Stress-induzierte Zellapoptose (Chiang et al., 2005; Yao et al., 2006). Nach diesen Studien verursachte NP einen Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Spiegel in Zellen. Auf diesem Weg kann NP die Calciumhomöostase und die Funktion des ER stören, was eine lang andauernde Aktivierung der ER-Stress-Signalwege bewirkt, welche letztendlich zu Zellapoptose führt.

Hughes und Mitarbeiter zeigten, dass NP die  $Ca^{2+}$ -Pumpen im ER der Testeszellen inhibieren kann, was eine Störung der intrazellulären Calciumhomöostase und Zelltod verursacht (Hughes et al., 2000). Mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie wurde von Gong und Mitarbeitern eine Schwellung des ER, assoziiert mit einer Lumenvergrößerung nachgewiesen. Diese Beobachtung unterstützt die Relevanz der Wirkung von NP auf das ER (Gong et al., 2009).

Mittels RT-PCR-Analyse wurde der Effekt von NP auf die ER-Stress-regulierte BiP-Genexpression untersucht. NP verursachte in niedrigen Konzentrationen (0,1-10  $\mu$ M) eine schwache, nichtsignifikant erhöhte BiP-Expression. Ab 20  $\mu$ M stieg die Expression von BiP stark an, sowohl nach 12 h als auch nach 24 h Expression (Gong et al., 2009). Eine Studie von Nakazawa und Ohno (2001) zeigte ebenfalls bei hoher Dosierung adverse Effekte. Hierbei wurden Neuronen aus Hippocampus und Cortex von Rattenfeteten (Trächtigkeitstag 18) isoliert und über 24 h gegenüber 10 nM und 10  $\mu$ M NP exponiert. Die metabolische Aktivität der Zellen diente als Maß für zytotoxische

Effekte. Sowohl in Neuronen aus Hippocampus als auch Cortex war bei der höheren Konzentration die metabolische Aktivität leicht inhibiert.

Der Mechanismus der Reproduktionstoxizität von NP ist den molekularen Mechanismen der bleiinduzierten neurodegenerativen Wirkung sehr ähnlich. Wir vermuten, dass eine Exposition gegenüber NP in höherem Alter eine verstärkte Produktion fehlgefalteter Proteinaggregate hervorrufen kann. Wie bereits gezeigt, hat das alternde Gehirn im Vergleich zum jungen Organismus eine reduzierte Kapazität der Reaktion auf ER-Stress. Untersuchungen zur Toxizität von NP im alternden Gehirn sollten die geringere Fähigkeit der Reaktion auf ER-Stress berücksichtigen, welche im alternden Gehirn beobachtet wurde.

Um die Hypothese zu unterstützen, dass NP dieselben Signaltransduktionswege wie Blei aktiviert, wurde eine toxikogenomische Analyse vorgenommen. Über die Identifikation biologischer Pfade und Prozesse, welche sowohl von NP als auch Blei affiziert werden, konnten wir für beide Substanzen relevante, überlappende Gene mit Hilfe von Venn-Diagrammen identifizieren.

Die „Comparative Toxicogenomics Database“ (CTD; <http://ctd.mdibl.org/>) enthält sowohl direkte als auch abgeleitete Gen-Krankheits-Beziehungen (vgl. Abschnitt 5.2). Direkte Gen-Krankheitsbeziehungen wurden von CTD-Kuratoren der veröffentlichten Literatur entnommen oder entstammen der OMIM-Datenbank. Indirekte Beziehungen wurden über Chemikalien-Gen-Wechselwirkungen aufgestellt (z.B. Gen A ist indirekt assoziiert mit Krankheit B, da Gen A eine Interaktion mit Chemikalie C hat und diese Chemikalie eine direkte Wechselwirkung mit Krankheit B aufweist).

Aus der CTD wurden 68 gemeinsame Wirkungspfade für Blei und NP identifiziert:

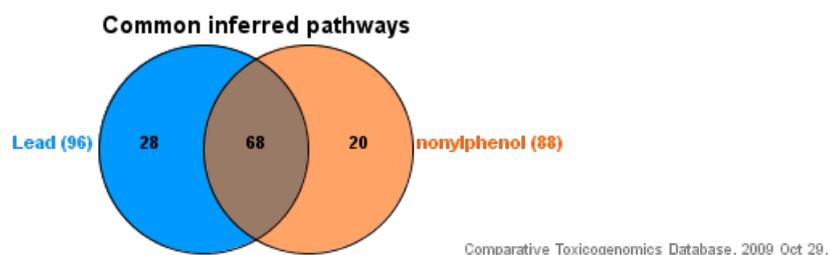


Abbildung 2-16: Gemeinsame Wirkungspfade (abgeleiteter Zusammenhang) für Blei und Nonylphenol nach Anwendung der CTD-Datenbank

Mehrere dieser Wirkungspfade waren mit typischen Wegen der Neurodegeneration assoziiert. Die für Blei und NP gemeinsamen Wirkungspfade schließen unter anderem ein (ohne Anspruch auf Vollständigkeit):

Alzheimer'sche Krankheit, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Apoptose, Calcium-abhängige Signalwege, Huntington'sche Krankheit, Langzeitdepression, Langzeitwirkungsverstärkung, MAPK-Signalweg und neuroaktive Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.

Die Ermittlung gemeinsam aktivierter Gene erbrachte auch 8 bekannte Genaktivierungen, welche bei der Neurodegeneration involviert sind.

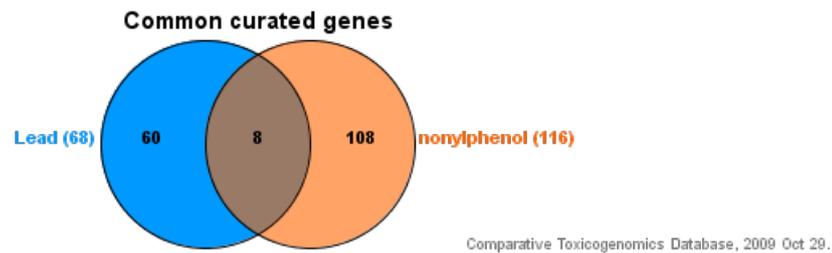


Abbildung 2-17: Gemeinsam aktivierte Gene (aufbereitete Auswertung) für Blei und Nonylphenol

Diese Gene sind: CYP1A1, HBA, HBB, HSP70, HSPA1A, MAPK1, MAPK3 und NFKB1 (Abkürzungen siehe Glossar am Ende des Kapitels). Besonders die MAPK-Gene sind eng mit neurodegenerativen Wirkungspfaden assoziiert.

Weiterhin aktiviert NP 9 verschiedene Gene, welche im Zusammenhang mit Calcium-abhängigen Signalwegen stehen: AVPR1B, CHR2, DRD1A, EDRB, GRM1, GRPR, P2RX2, PTGFR, TACR2.

Die CTD-Analyse identifizierte weiterhin andere Chemikalien, welche eine vergleichbare Menge an mit NP interagierenden Genen aufweisen. Diese wurden hinsichtlich der Strukturähnlichkeit und der Anzahl gemeinsamer interagierender Gene kategorisiert, wie aus der folgenden Tabelle 2-1 zu ersehen ist.

Tabelle 2-1: Auszug der CTD-Website zu Nonylphenol

Gleichheitsindex	Substanz	gemeinsame interagierende Gene
0.204	Dibutylphthalat	38
0.193	Di-(2-ethylhexyl)phthalat	39
0.151	Methoxychlor	28

### 2.3.6 Di-(2-ethylhexyl)phthalat

Di-(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ist der wichtigste Weichmacher. Die farblose, viskose Flüssigkeit ist lipophil und wenig wasserlöslich. DEHP besitzt gute Weichmachereigenschaften. Wegen seiner günstigen Eigenschaften und niedriger Herstellungskosten wird DEHP in großem Umfang als Weichmacher vor allem bei der Herstellung von Gegenständen aus PVC eingesetzt. Kunststoffe können zwischen 1 und 40% DEHP enthalten. Weiterhin findet es Verwendung als Komponente von Hydraulikflüssigkeiten und Dielektrika in Kondensatoren. Es wird auch als Lösungsmittel in Lippenstiften verwendet. DEHP findet sich in verschiedenen Nahrungsmitteln, so z.B. Fisch, Schalentieren, Eiern und Käse. Mehrere Studien belegen das Auftreten von testikulärer Atrophie nach DEHP-Exposition. Die Gefahrstoff-Kennzeichnung für diese Substanz basiert hauptsächlich auf Reproduktionstoxizität (Fruchtschädigung, verminderte Fertilität).

Nach CTD-Analyse kann DEHP mit 11 Genen interagieren, welche im Zusammenhang mit Calcium-abhängigen Signalwegen stehen: ADORA2A, ADRA1A, ADRA1B, AVPR1B, CHRM5, DRD1A, F2R, LHCGR, P2RX2, TACR1 und TACR2.

Im folgenden Diagramm wird ein Vergleich gemeinsamer Wirkungspfade für Blei, NP und DEHP gezeigt.

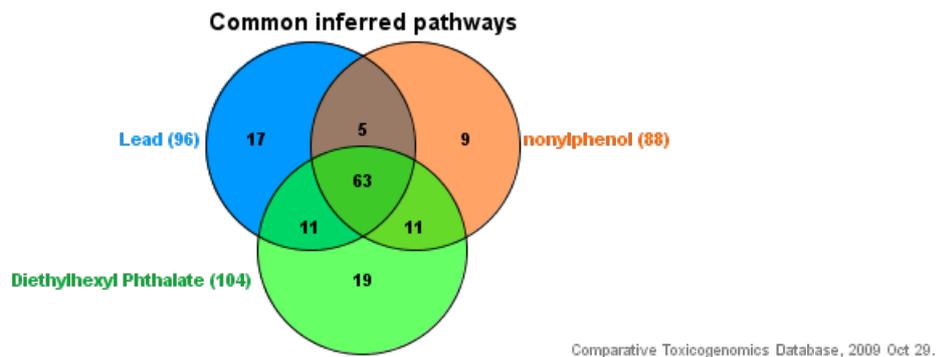


Abbildung 2-18: Gemeinsame Wirkungspfade (abgeleiteter Zusammenhang) für Blei, Nonylphenol und DEHP nach Anwendung der CTD-Datenbank

Aus diesem Venn-Diagramm ergeben sich für die 3 Umweltschadstoffe Blei, NP und DEHP 63 gemeinsame Wirkungspfade. Diese beinhalten (ohne Anspruch der Vollständigkeit):

Adipocytokin-abhängige Signalwege, Alzheimer'sche Krankheit, Apoptose, Calcium-Signalwege, Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Signalwege, Huntington'sche Krankheit, Langzeitdepression, Langzeitwirkungsverstärkung und MAPK-Signalweg.

Weiterhin untersuchten wir, inwieweit es gemeinsam aktivierte Gene bei allen drei Chemikalien gibt.

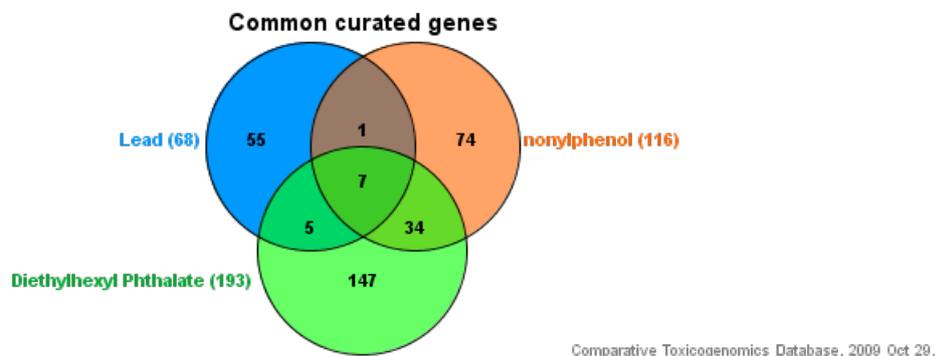


Abbildung 2-19: Gemeinsam aktivierte Gene (aufbereitete Auswertung) für Blei, Nonylphenol und DEHP nach Auswertung der CTD Datenbank

Alle 3 Substanzen interagieren mit den folgenden 7 kuratierten Genen: CYP1A1, HBA, HBB, HSP70, MAPK1, MAPK3 und NFKB1. Besonders die MAPK-Gene sind eng mit neurodegenerativen Wirkungspfaden assoziiert. Weiterhin gibt es 34 weitere kuratierte Gene, bei denen DEHP und NP eine Interaktion zeigen.

DEHP wurde als Weichmacher in medizinischen Hilfsmitteln wie Schläuche und Behälter für intravenöse Applikationen, Katheder, nasogastrale Sonden, Dialysebeuteln und -schläuche verwendet. Signifikante Mengen an DEHP aus Weich-PVC-Behältern können in das darin aufbewahrte Blut diffundieren und so eine Exposition von Patienten verursachen, welche Bluttransfusionen erhalten. Zur Ermittlung des Gefährdungspotenzials dieser Substanz untersuchten Dhanya et al. die Toxizität von DEHP. Sie ermittelten nach einer ip-Applikation von 7,5 mg/kg Körpergewicht an Ratten die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in Leber-, Gehirns- und Erythrozytenmembranen, die Aktivität wurde durch die Behandlung signifikant inhibiert. Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in Erythrozyten stieg an, was möglicherweise durch eine Störung der Calcium-abhängigen Signalwege im ER hervorgerufen wird. Die Effekte waren innerhalb von 7 Tagen nach Expositionsende reversibel, die Aktivitäten der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPasen näherten sich wieder dem Normalwert an. Wegen der Reversibilität der Effekte vermuten die Autoren, dass DEHP-Toxizität nach nur wenigen Bluttransfusionen kein ernsthaftes Problem darstellen sollte, jedoch bei Patienten mit wiederholten Bluttransfusionen wie Thalassemie- oder Hämodialysepatienten (Dhanya et al., 2003).

Bei eingeschränkter ER-Stress-Antwort im alternden Gehirn ist es jedoch möglich, dass DEHP die irreversible Akkumulation fehlgefalteter Proteine induziert, was zu einer Induktion oder Verstärkung neurodegenerativer Prozesse führen könnte.

DEHP hat pseudo-östrogene und hormonmodifizierende Eigenschaften. Es besteht eine Empfehlung für die Nichtverwendung von medizinischen DEHP-haltigen Gerätschaften bei männlichen Neonaten, schwangeren Frauen mit männlichen Föten sowie männlichen Jugendlichen in der Pubertät. Möglicherweise sind ältere Personen (mit reduzierter ER-Stress-Antwort) eine weitere Risikogruppe.

### 2.3.7 Methoxychlor

Die Produktion von Methoxychlor und die Verwendung als Pestizid zur Bekämpfung einer Vielzahl von Schädlingen (besonders Käufern) in Getreide, Tierställen, Molkereien, Haushalt und Industrie sowie in der Forstwirtschaft führen zu einer direkten Freisetzung in die Umwelt. Für das pro-östrogene Pestizid wurde ein Dampfdruck von  $2,6 \times 10^{-6}$  mm Hg (ca.  $2 \times 10^{-4}$  Pa) bei 25 °C gemessen. Aus diesem Grund kann Methoxychlor sowohl in der Dampfphase als auch (vorwiegend) partikulär vorliegen.

Da Methoxychlor in Tieren reproduktionstoxisch wirkt, wird der Exposition der sich entwickelnden Leibesfrucht und von Kleinkindern zunehmend Bedeutung beigemessen. Akute Exposition gegenüber Methoxychlor während kritischer Entwicklungsstadien könnte also adverse Effekte auf das reproduktive System beim Menschen bewirken (Savabieasfahani et al., 2006).

Nach CT D-Analyse kann Methoxychlor mit 3 Genen des Calcium-abhängigen Signalweges interagieren: EGFR, NOS2, OXTR. Insgesamt gibt es 58 gemeinsame betroffene Wirkungspfade zwischen Blei, NP und Methoxychlor, sowie 14 weitere gemeinsame Wirkungspfade zwischen Blei und Methoxychlor.

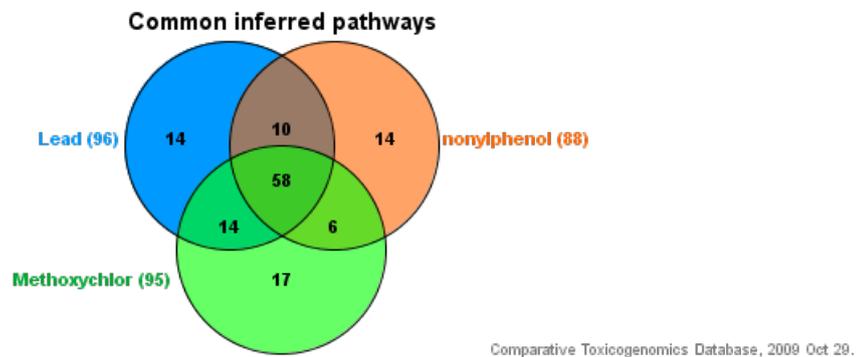


Abbildung 2-20: Gemeinsame Wirkungspfade (abgeleiteter Zusammenhang) für Blei, Nonylphenol und Methoxychlor nach Anwendung der CTD-Datenbank

Die für Blei, NP und Methoxychlor gemeinsamen Wirkungspfade umfassen (ohne Anspruch auf Vollständigkeit):

Adipocytokin-abhängige Signalwege, Alzheimer'sche Krankheit, Apoptose, Axonführung, Calcium-Signalwege, Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Signalwege, Huntington'sche Krankheit, Langzeitdepression, Langzeitwirkungsverstärkung, MAPK-Signalweg, NK-zellvermittelte Zytotoxizität und neuroaktive Ligand-Rezeptor-Interaktionen.

Weiterhin untersuchten wir, welche gemeinsam aktivierten Gene zwischen diesen Substanzen vorliegen.

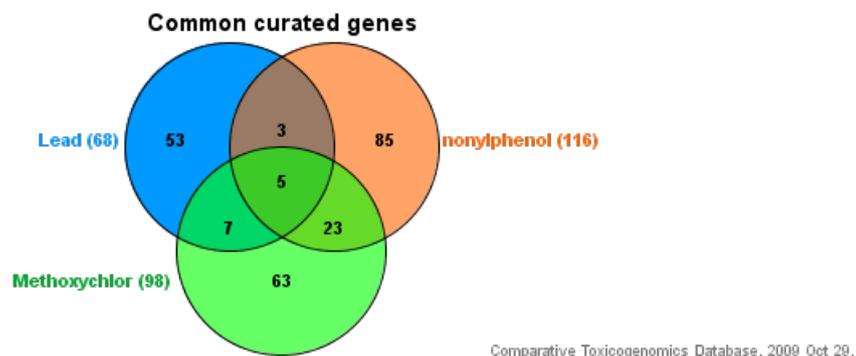


Abbildung 2-21: Gemeinsam aktivierte Gene (aufbereitete Auswertung) für Blei, Nonylphenol und Methoxychlor nach Auswertung der CTD-Datenbank

Alle drei Chemikalien interagieren mit folgenden 5 Genen: CYP1A1, HSPA1A, MAPK1, MAPK3 und NFKB1 (aufbereitete Auswahl). Wie bereits erwähnt sind besonders die MAPK-Gene eng mit neurodegenerativen Wirkungspfaden assoziiert.

Weiterhin gibt es weitere 23 kuratierte Gene, welche mit Methoxychlor und NP interagieren und 7 weitere für die Interaktion von Methoxychlor und Blei.

Berufliche Exposition gegenüber Methoxychlor kann durch Inhalation oder Dermalkontakt an Arbeitsplätzen erfolgen, wo die Substanz produziert oder verwendet wird. Monitoringdaten geben Hinweise darauf, dass die Allgemeinbevölkerung über den Außenluft, Aufnahme kontaminierter Lebensmittel und Trinkwasser sowie durch dermalen Kontakt exponiert sein kann. Methoxychlor wird infolge seiner Anwendung als Pestizid für Getreide in getreidehaltigen Nahrungsmitteln gefunden.

Wir schlagen vor, dass Methoxychlor hinsichtlich seiner adversen Wirkungen bei älteren Personen untersucht wird.

### **Glossar zu Abschnitt 2.3**

**HBA:** Hemoglobin alpha chain complex

**HBB:** Hemoglobin, beta

**HSP70:** Heat shock cognate 70-kd protein

**HSPA1A:** Heat shock 70kDa protein 1A

**MAPK1:** Mitogen-activated protein kinase 1

**MAPK3:** Mitogen-activated protein kinase 3

**NFKB1:** Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

**AVPR1B:** Arginine vasopressin receptor 1B

**CHRM2:** Cholinergic receptor, muscarinic 2

**DRD1A:** Dopamine receptor D1A

**EDNRB:** Endothelin receptor type B

**GRM1:** Glutamate receptor, metabotropic 1

**GRPR:** Gastrin-releasing peptide receptor

**P2RX2:** Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2

**PTGFR:** Prostaglandin F receptor (FP)

**TACR2:** Tachykinin receptor 2

**ADORA2A:** Adenosine A2a receptor

**ADRA1A:** Adrenergic, alpha-1A-, receptor

**ADRA1B:** Adrenergic, alpha-1B-, receptor

**AVPR1B:** Arginine vasopressin receptor 1B

**CHRM5:** Cholinergic receptor, muscarinic 5

**DRD1A:** Dopamine receptor D1A  
**F2R:** Coagulation factor II (thrombin) receptor  
**GRIN1:** Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1  
**LHCGR:** Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor  
**P2RX2:** Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2  
**TACR1:** Tachykinin receptor 1  
**TACR2:** Tachykinin receptor 2

### 2.3.8 Zusammenfassung und Diskussion

Das vorgestellte Beispiel stellt eine Anwendung der "Comparative Toxicogenomics Database" (CTD) dar, die in Abschnitt 5.2 näher beschrieben ist. Mit Hilfe dieser Datenbank können Daten zu Genexpressionsveränderungen aufgrund von Chemikalieneinwirkungen erfasst und mit weiteren Substanzen verglichen werden. Da die Datenbank zugleich einen Zusammenhang mit möglichen Erkrankungen (dabei auch komplexen Erkrankungen wie z.B. Veränderung des Fettstoffwechsels, neurologischen Erkrankungen oder Herz-Kreislauf-Krankheiten) und Genen herstellt, können schließlich auch Interaktionen zwischen Chemikalien und Krankheiten postuliert werden (vgl. Abbildung 2-22), die in einem Folgeschritt näher zu untersuchen sind. Im konkreten Fall wäre die neurotoxische Wirkung von Phthalaten, Nonylphenol und Methoxychlor zu adressieren.

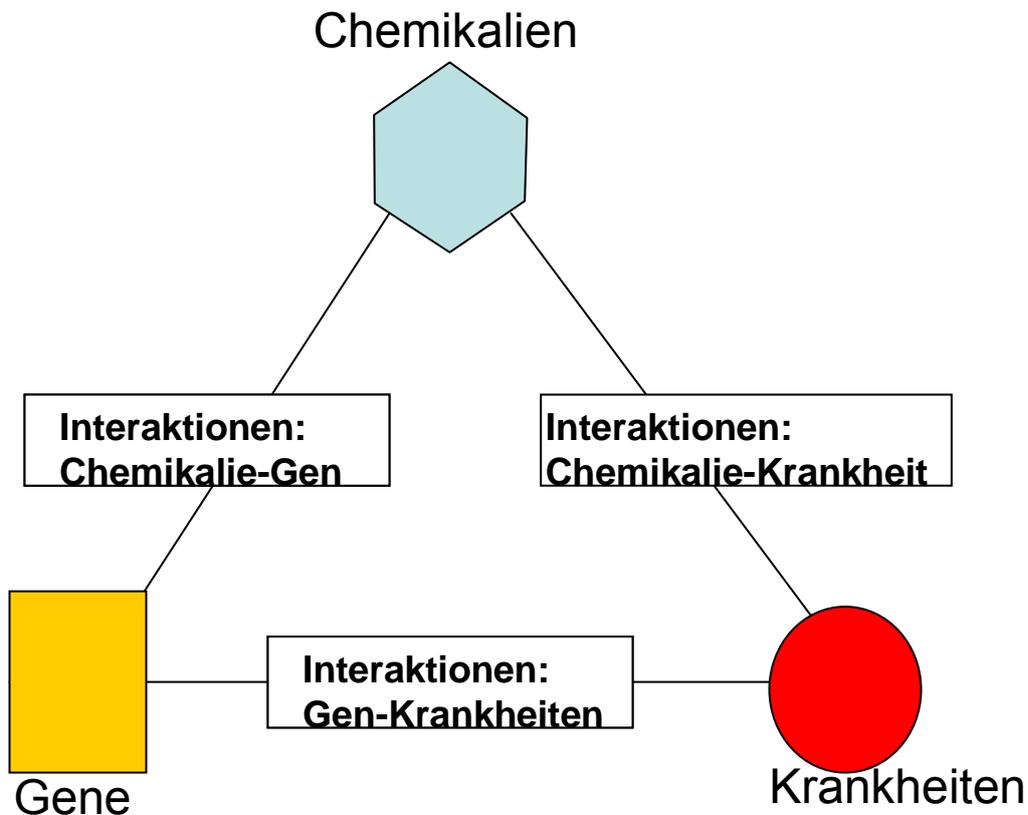


Abbildung 2-22: Ausleuchtung möglicher Zusammenhänge zwischen Chemikalien und Krankheiten aufgrund von Kenntnissen zu Genomics (Chemikalien-Genomanalysen) bzw. zwischen Krankheiten und genetischen Veränderungen mit Hilfe der „Comparative Toxicogenomics Database“ (CTD)

Quelle: in Anlehnung an <http://ctd.mdibl.org/> (Titelseite)

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten z.B. Gohlke et al. (2009), um Zusammenhänge zwischen Störungen im Fettstoffwechsel und der Exposition gegenüber Phthalaten zu postulieren oder komplexen neurotoxischen Effekten von Acetylcholinesterasehemmern. Auch für die Darstellung plausibler – und durch die Genexpression gestützter – Zusammenhänge zwischen Exposition gegenüber Arsenverbindungen und Krankheiten konnte die Datenbank herangezogen werden (Davis et al., 2009). Dabei wurden Endpunkte mit der Arsenexposition assoziiert, die bisher nicht bekannt waren (wie Urogenital-, Muskuloskeletal sowie Bluterkrankungen und Arsenexposition).

Im konkreten Beispiel im vorliegenden Projekt wurde versucht, Erkenntnisse zur Rolle des endoplasmatischen Retikulums in Verbindung mit Stress zu analysieren. Erkenntnisse zu Blei und entsprechender Genexpression wurden genutzt, um eine ähnliche Wirkung bei anderen Substanzen mit ähnlicher Genexpression zu vermuten. Damit kann einerseits eine gezielte Testung erfolgen, ob eine solche Ähnlichkeit tatsächlich besteht. Andererseits können aber auch Interaktionen bei komplexen Gemischen vermutet werden, da die Toxizitätspfade der jeweiligen Einzelsubstanzen sich

überschneiden, so dass eine unabhängige Wirkung weniger wahrscheinlich ist. Im vorliegenden Beispiel wird eine mögliche Kombinationswirkung von Nonylphenol, Phthalaten und Methoxychlor über die teilweise ähnliche Genexpression begründet. Damit ist bereits das Thema Gemische angeschnitten, zu dem die Analyse von ähnlicher Genexpression mit Hilfe der CTD-Datenbank hilfreich sein kann und das im Folgeabschnitt (Abschnitt 3) noch vertieft werden soll.

### **3 Zusammenwirken von Fremdstoffen – Hinweise auf Basis der Toxizitätspfadanalyse**

#### **3.1 Gemische und Ah-Rezeptor vermittelte Effekte**

##### **3.1.1 Einführung**

Die Aktivierung von Zellrezeptoren ist eine wichtige Funktion bei der DNA-Expression des Organismus. Es gibt zahlreiche endogene und exogene Substanzen, welche die Aktivierung der Rezeptoren bewirken und somit die DNA-Expression beeinflussen können. Diese so genannten rezeptorvermittelten Ereignisse können allgemein durch folgende Eigenschaften charakterisiert werden:

1. Sie sind auf diejenigen Zellen beschränkt, welche den entsprechenden Rezeptor exprimieren
2. Sie zeigen Struktur-/Aktivitätsbeziehungen (d.h. die Potenz variiert mit Änderung der geometrischen Konfiguration eines Moleküls)
3. Die Bindung erfolgt mit hoher Affinität (d.h. bereits bei relativ geringen Ligandenkonzentrationen)
4. Die Bindung an den Rezeptor ist reversibel
5. Die Stärke der Wirkung ist proportional zur Anzahl der ligandenbesetzten Rezeptoren

##### **3.1.2 Historie des Arylkohlenwasserstoff (Ah)- Rezeptors**

Ältere Tierstudien von Poland und Mitarbeitern zeigten die Existenz eines intrazellulären Rezeptors, der effektiv an Polychlorierte Dibenzodioxine (im Folgenden kurz Dioxine genannt) und Substanzen mit ähnlicher Struktur bindet (Poland und Glover, 1973; Poland und Kutson, 1982). Dieser Rezeptor wurde Arylkohlenwasserstoff (Ah)-Rezeptor genannt.

Menschliche Zellen verschiedenster Gewebe exprimieren ein intrazelluläres Protein, welches dem Ah-Rezeptor in Tieren ähnelt (Cook und Greenlee, 1989; Harris et al., 1989; Lorenzen und Okey, 1991; Manchester et al., 1987; Waithe et al., 1991). Der isolierte humane Rezeptor weist etwa die gleiche Sedimentationsrate, Molekulargewicht und Bindungsspezifität auf wie der murine Ah-Rezeptor (Harper et al., 1988). Da sowohl menschliche als auch tierische Zellen diesen Rezeptor enthalten, können Erkenntnisse aus dem Tiermodell zum Verständnis der Effekte von Xenobiotika auf menschliche Zellen extrapoliert werden.

Molekularbiologische Studien zeigten, dass der Ah-Rezeptor ein hochkonserviertes Protein ist, welches eine wichtige Rolle bei der Organogenese von Leber, Lunge und dem Immunsystem spielt. Aus diesem Grund wird die Existenz eines endogenen Liganden des Ah-Rezeptors angenommen. Dieser Ligand und seine Funktion wurden aber noch nicht identifiziert (Smart und Hodgson, 2008).

### **3.1.3 Molekulare Mechanismen der Toxizität von Dioxinen und dioxinartigen Chemikalien**

Freie Ah-Rezeptoren sind im Zytoplasma lokalisiert, wo sie im Komplex mit 2 anderen Proteinen vorliegen: heat shock protein 90 (HSP90) und Chaperon-Ah-Rezeptor-interagierendes Protein (AIP). Nach Aktivierung durch einen Liganden findet eine Translokation in den Zellkern und eine Dissoziation von HSP90 und AIP statt, gefolgt von der Bildung eines Heterodimers mit dem Ah-Rezeptor-Nukleärtransporter Protein (Arnt). Dieser Komplex hat eine hohe Affinität für eine bestimmte regulatorische Erkennungssequenzen der DNA, das „dioxin responsive element“ (DRE). Am besten untersucht ist die DRE-induzierte Expression des Cytochrom P 4501A1 (CYP1A1) (Mitchell und Efferink, 2009). Dieses Enzym ist am Phase 1-Metabolismus von Xenobiotika beteiligt (Nebert und Dalton, 2006; Smart und Hodgson, 2008). Dieser Prozess ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Nach Aktivierung des CYP1A1 löst sich der Ah-Rezeptor-Arnt-Komplex von der DNA. Nach Dissoziation des Komplexes wird der Ah-Rezeptor durch Proteasom 26S abgebaut, was eine weitere CYP1A1-Expression verhindert.

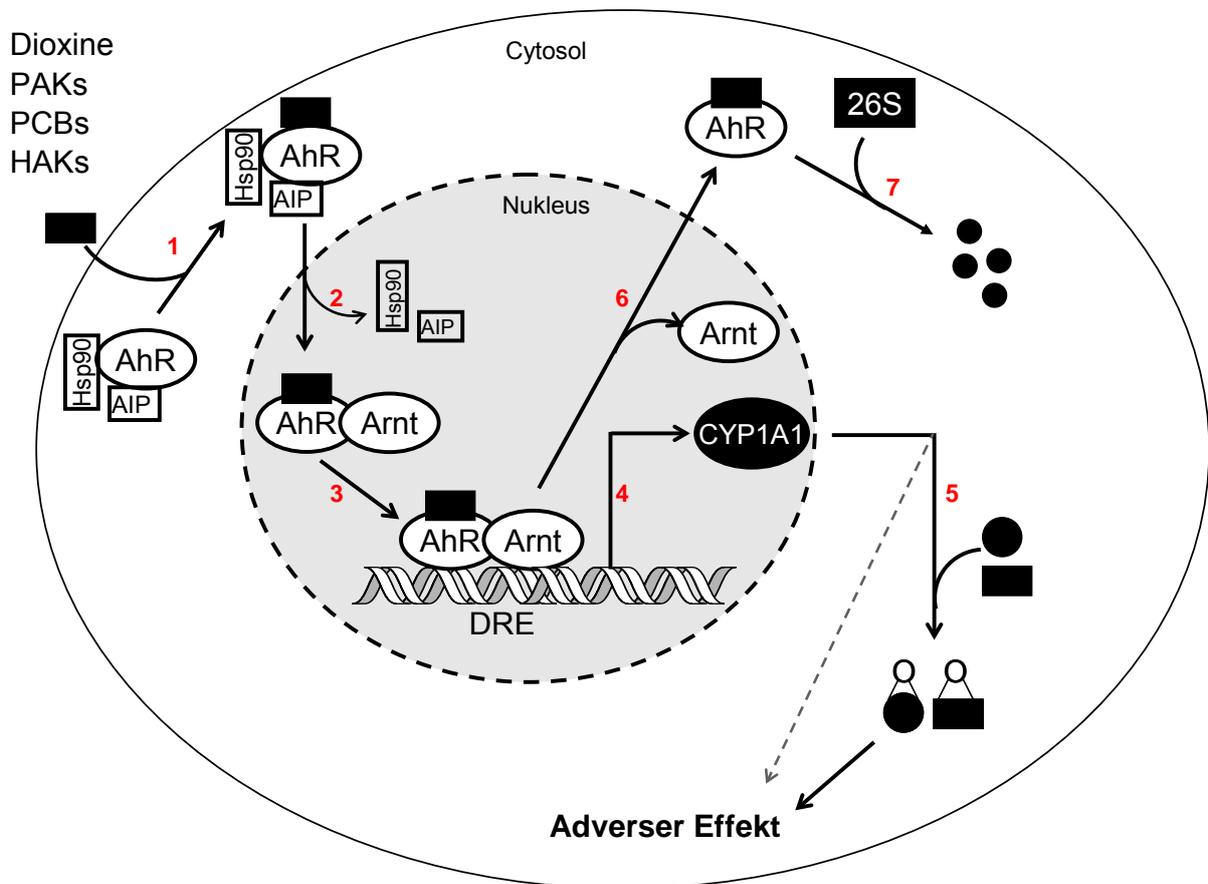


Abbildung 3-1: Biochemische Mechanismen der Aktivierung des Ah-Rezeptors und der CYP-Induktion

1) Ein Ah-Agonist wie z.B. TCDD bindet im Cytosol an den Ah-Rezeptor. 2) Dieser Komplex wird in den Zellkern transportiert, die assoziierten Proteine werden freigesetzt und es erfolgt Bindung an Arnt. 3) Der Ah-Rezeptor/Arnt-Komplex bindet an DRE 4) CYP1A1 wird aktiviert. 5) CYP1A1 kann den Ah-Rezeptoragonisten zum löslichen Epoxid oxidieren, welches entweder adverse Effekte hervorrufen oder eliminiert werden kann. 6) Nach der Aktivierung dissoziiert der Ah-Rezeptor/Arnt-Komplex von der DNA und verlässt den Zellkern. 7) „Verbrauchte“ Ah-Rezeptoren werden über eine Aktivierung der 26S Proteasomen ubiquitiniert und abgebaut. Darstellung modifiziert nach Mitchell und Efferink (2009). PAK= Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe; HAK=Halogenierte Aromatische Kohlenwasserstoffe; PCB= Polychlorierte Biphenyle

### 3.1.4 Adverse Effekte

Eine komplette Übersicht über die verschiedenen adversen Wirkungen, welche durch Dioxine und dioxinähnliche Substanzen verursacht werden, würde den gegebenen Rahmen weit übersteigen. Die meisten der vorliegenden Studien dokumentieren immunsuppressive (Kerkvliet, 2009; Marshall et al., 2008) und kanzerogene Wirkungen (Schwarz und Appel, 2005) von Ah-Rezeptor-Agonisten.

Die in der Literatur beschriebenen zwei Hauptwirkungen sind Effekte, welche durch die Metabolisierung von Ah-Rezeptor-Agonisten ausgelöst werden und Effekte, wel-

che von Ah-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsprozessen herrühren. Im ersten Fall werden Chemikalien üblicherweise zu ihren Epoxiden metabolisiert, welche DNA-Addukte bilden können (Kerkvliet, 2009; Xue und Warshawsky, 2005). Diese DNA-Adduktbildung kann u. U. zur Tumorbildung führen. Der andere Wirkungspfad führt zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies, Lipidperoxidation oder verschiedenen Arten von Immuninfiltration.

### 3.1.5 Die Struktur von Dioxin und dioxinartigen Verbindungen

Alle aromatischen Verbindungen, welche einen planaren, rechtwinkligen Raum von 0,68 nm Höhe, 1,4 nm Breite und 0,4 nm Tiefe ausfüllen und eine passende Oberflächenpolarität besitzen (4 Chlor- oder 3 Bromatome in lateralen Positionen erwiesen sich als am aktivsten) sind der Klasse der dioxinartig wirkenden Substanzen zuzuordnen (vgl. Abbildung 3-2).

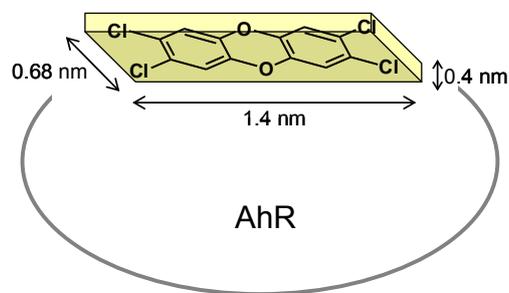
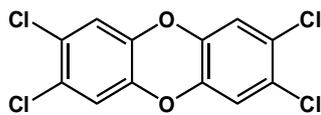


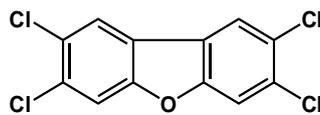
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Ah-Rezeptorbindungsstelle, besetzt mit einem TCDD-Molekül

Dioxine sind die toxischsten Chemikalien anthropogenen Ursprungs. Die akute orale LD50 des 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-dioxin (TCDD) bei Meerschweinchen ist 0,6 µg/kg Körpergewicht, bei Ratten und Menschen etwa 30 µg/kg Körpergewicht. Die Bindungsaffinität zum humanen Ah-Rezeptor ist 5-10 mal niedriger als bei Mäusen (5-10 nM vs. 0,8-3 nM in murinen hepa1-Zellen (Manchester et al., 1987)). Abbildung 3-3 zeigt die Struktur und Bezeichnung von TCDD und strukturverwandten Verbindungen.



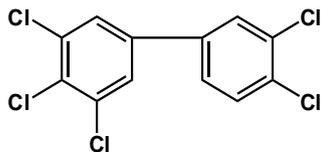
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[b,e][1,4]dioxin

TCDD



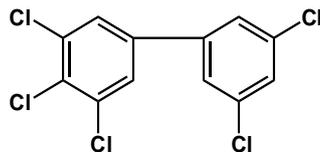
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[b,d]furan

PCDF



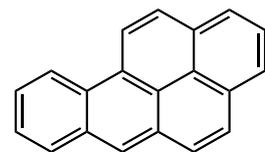
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl

PCB-126



3,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl

PCB-127



Benzo[a]pyren

BaP

Abbildung 3-3: Beispiele für umweltrelevante dioxinartige Chemikalien

Polychlorierte Biphenyle (PCB) sind in der Umwelt häufig nachzuweisende Substanzen mit z. T. dioxinartigen Wirkungen. Abhängig von Chlorierungsgrad und Position der Chloratome existieren insgesamt 209 Strukturvarianten, welche als Kongenere bezeichnet werden. Die Toxizität der PCB wird stark durch die Position der Chlorsubstituenten bestimmt. So vermindert sich z.B. die Aktivität der Ah-Rezeptoraktivierung bereits bei Wechsel der Position eines Chloratoms um den Faktor 50000 (PCB-126: 3,3',4,4',5-PentaCB im Vergleich zu PCB-127: 3,3',4,5,5'-PentaCB).

### 3.1.6 Toxische Wirkungen und Symptome von dioxinvermittelter Ah-Rezeptoraktivierung

Zwei bekannte Beispiele von dioxinvermittelter Toxizität sind die Yusho- (Japan, Kanagae et al., 1987) und die Yu-Cheng-Episoden (Taiwan, Chang et al., 1980). Im Folgenden werden die Befunde der Studie von Chang et al. (1980) kurz dargestellt.

Die Verwendung von mit PCB und Polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) kontaminiertem Speiseöl führte zu einem epidemischen Krankheitsausbruch in Taiwan (als Yu-Cheng oder „Ölkrankheit“ bezeichnet). Symptome waren u.a. Chlorakne, Hyperpigmentierung und Dilatation der Meibom'schen Drüsen (Chang et al., 1980). Diese Epidemie wurde im Mai 1979 erkannt, das Öl im Oktober dieses Jahres vom Markt genommen. Ca. 2000 betroffene Personen wurden registriert. Da diese Schadstoffe in Humangewebe persistieren, wurden auch nach Beendigung der maternalen Exposition geschädigte Nachkommen beobachtet. Im April 1985 wurde eine Feldstudie über alle lebenden Kinder, die potenziell während oder nach der Ölkontamination in utero exponiert waren, durchgeführt. Diese Kinder waren transplazental und wahrscheinlich auch über die Muttermilch exponiert, hatten aber nicht selbst kontaminiertes Speiseöl genossen (Rogan et al., 1988).

Aussagkräftige Daten wurden von 128 exponierten Kindern erhoben, welche mit 115 nicht exponierten Kontrollkindern der gleichen Region verglichen wurden. Die Untersuchung erbrachte, dass die exponierten Kinder bei Geburt kleiner waren und das Geburtsgewicht vermindert war ( $2749 \pm 46$  g im Vergleich zu  $3228 \pm 40$  g bei den Kontrollen). Die auffälligsten Unterschiede zwischen den Betroffenen und den Kontrollen waren eine höhere Rate an Bronchitis, Hyperpigmentation, Konjunktivitis, Nagelveränderungen und natalen Zähnen. Die exponierten Kinder zeigten durchgängig Entwicklungsverzögerungen (32 von 33 untersuchten Entwicklungsparametern). Beispiele hierfür waren das jeweilige Alter, bei dem die Fähigkeit zur Bildung von Wörtern und Sätzen, zum Umblättern von Seiten, Äußern von Wünschen, Differenzierung von Körperteilen, Halten von Stiften, Imitieren von kreisförmigen Bewegungen oder Fangen eines Balls erlangt wurden.

Vergleichbare Entwicklungsstörungen wurden auch bei Rhesusaffen beobachtet, welche transplazental gegenüber PCB exponiert waren (Bowman et al., 1978). Eine wahrscheinliche Ursache sind hochtoxische PCDF im Speiseöl (Yamazaki et al., 1982). Qualitativ zeigen PCB und PCDF ein vergleichbares Wirkungsprofil, die PCDF sind aber bereits bei niedrigeren Dosen wirksam. Das taiwanesisches Speiseöl enthielt ca. 100 mg/kg PCB und etwa 0,1 mg/kg PCDF (Chen et al., 1984). Wegen der höheren Wirksamkeit der PCDF wurde ein beträchtlicher Anteil der toxischen Effekte bei beiden Vergiftungsepisoden der PCDF-Kontamination zugeschrieben. Die Humandaten wurden auch durch *in vivo* und *in vitro* Studien an Labortieren bestätigt, welche immunsuppressive Effekte der PCDF, Polyhalogener Biphenyle und Dioxinen zeigten (Davis und Safe, 1988; Allen et al., 1977; Lubet et al., 1986; McConnell et al., 1978).

### 3.1.7 REP, TEF und TEQ: Werkzeuge zur Abschätzung der Toxizität von Umweltchemikalien

Allen Einzelkomponenten von Gemischen von Ah-Rezeptorantagonisten wird die Bindung an derselben Bindungsstelle des Ah-Rezeptors unterstellt. Dieses Szenario wird als „complex similar action“ bezeichnet (van Leeuwen, 2007). Bei gleichzeitiger Einwirkung von zwei oder mehr Verbindungen auf dieselbe Bindungsstelle findet jedoch Konkurrenz statt. In Abhängigkeit von der Affinität jeder Einzelkomponente des Gemischs können additive, antagonistische (unteradditive) oder synergistische (überadditive) Wirkungen auftreten. Die einfachste Form eines additiven Effekts ermöglicht eine direkte Vorhersage der Toxizität des Gemischs. Dieser Fall liegt jedoch nur vor, wenn intrinsische Aktivität und Affinität der Komponenten eines Gemischs identisch sind. Dies ist aber in den seltensten Fällen zutreffend, da Unterschiede in Aktivität und Affinität die Abschätzung der genauen Toxizität eines komplexen Kongenergemischs erschweren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts das Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ) entwickelt. Zur Abschätzung der Summe der TEQ eines Gemischs aus dioxinartigen Substanzen wird der mengenmäßige Anteil jeder toxischen Komponente mit ihrem Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF) multipliziert und aufaddiert. Das TEQ einer Probe kann wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{ng TEQ/kg} = & \text{Konzentration Substanz}_1 \text{ (ng/kg)} \times \text{TEF-Wert für Substanz}_1 + \\ & \text{Konzentration Substanz}_2 \text{ (ng/kg)} \times \text{TEF-Wert für Substanz}_2 + \\ & \text{Konzentration Substanz}_3 \text{ (ng/kg)} \times \text{TEF-Wert für Substanz}_3 + \dots \end{aligned}$$

Das TEQ-Konzept ist aber nur auf spezifische adverse Effekte anwendbar, z.B. kanzerogene und immunsuppressive Effekte, welche die gleichen Endpunkte wie Dioxine betreffen. Andere toxische Effekte von Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen können mit dieser Methode nicht quantifiziert werden. Um also mit Hilfe des TEQ-Konzepts erfasst werden zu können, muss eine Substanz

1. strukturverwandt zu Dioxinen sein
2. an den Ah-Rezeptor binden können
3. dioxinähnliche Wirkungen besitzen und
4. eine persistente Chemikalie sein, welche in der Nahrungskette akkumuliert.

Die relative Potenz (REP) einer dioxinartigen Chemikalie wird im Bezug zu TCDD abgeleitet (TEF: 1). Auf Basis aller verfügbaren REP-Werte für eine bestimmte Substanz wurden von Expertengruppen TEF abgeleitet. Je mehr REP-Daten (*in vitro* und *in vivo* Daten zu subchronischer und chronischer Exposition) zu einer Verbindung vorliegen, umso verlässlicher sollte der TEF sein. REP werden z.B. durch den Vergleich der Dosis-Wirkungskurve mittels des EC50-Werts einer Substanz im Vergleich zu TCDD bestimmt. Der Vergleich kann auch durch Steigerung der Konzentration der Testsubstanz bis zum Erzielen der vergleichbaren Wirkung wie TCDD erfolgen.

### Re-Evaluierung der TEF (2005)

Von der WHO wurde eine REP-Datenbank geschaffen, um einen Ausgangspunkt für verlässlichere Daten zur Ableitung von TEF zu schaffen (Haws et al., 2006). Hierbei traten Probleme bei der Überprüfung der Daten zu REP in Säugern für dioxinähnliche Substanzen auf. Sogar bei den am besten untersuchten Substanzen wie 2,3,4,7,8-PentaCDF und PCB-126 lagen wesentliche Datenlücken vor (Haws et al., 2006). Signifikante Unterschiede bei REP für eine bestimmte Substanz wurden mit unterschiedlichen Studiendesigns (akute v.s. subchronisch oder chronisch), unterschiedlichen Endpunkten, Spezies und Mechanismen sowie unterschiedlichen Methoden bei der Ableitung der REP erklärt. Deshalb bedingen unterschiedliche methodische Ansätze in verschiedenen Studien Unsicherheiten bei Ableitung und Vergleich der REP. Bei der 2005 erfolgten Re-Evaluierung der TEF beschloss ein Expertengremium eine Standardisierung und Klassifizierung der REP-Daten. Im Folgenden werden die wichtigsten verwendeten Standards auszugsweise wiedergegeben (vollständig in Haws et al., 2006):

- Ein Endpunkt muss eine etablierte Ah-Rezeptor-vermittelte Wirkung aufweisen, welche sowohl für das Testkongener als auch für die Referenzsubstanz nachgewiesen ist
- *In vivo* und *in vitro* Studien werden getrennt bewertet

- Studien mit nur einer Dosishöhe werden nicht berücksichtigt
- Auch REP, welche auf quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) basieren, werden berücksichtigt.

Die so ermittelten TEF der PCDD und strukturverwandten Substanzen finden sich in Van den Berg et al. (2006).

Die Additivität ist eine Grundvoraussetzung des TEF-Konzepts und speziell dieser Aspekt wurde 2005 durch das Expertengremium detailliert überprüft. Hierbei ergab sich, dass die Ergebnisse neuerer *in vivo* Studien mit Gemischen dioxinähnlicher Substanzen mit dem Prinzip der Additivität konsistent sind und deshalb den TEF-Ansatz unterstützen (Fattore et al., 2000; Gao et al., 1999; Hamm et al., 2003; Walker et al., 2005). Das Expertengremium betrachtete auch eine Gemisch-Studie des National Toxicology Program (NTP). Auch hier unterstützen die Ergebnisse das Konzept der Additivität (Walker et al., 2005). In dem Bericht bemerken die Experten, dass die Übereinstimmung angesichts der komplexen experimentellen Situation in subchronischen Studien mit kongener-spezifischen toxikodynamischen und – kinetischen Wechselwirkungen erstaunlich gut sei. Zudem wurden die TEF der WHO 1998 anhand einer Spanne von REP auf Basis verschiedener biologischer Modelle und Endpunkte abgeleitet und stellen somit Schätzungen mit der Unsicherheit einer Größenordnung dar (Van den Berg et al., 2006).

### **3.1.8 Drei Korrekturfaktoren wären für genauere Aussagen mit TEQ Methode erforderlich**

In diesem Abschnitt schildern wir die Ergebnisse von zwei 2-Jahresstudien, welche im Rahmen des NTP durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen erforschten die Toxizität und Kanzerogenität von:

A: TCDD (Studien-Nummer C96007G)

B: einem Gemisch von TCDD, 2,3,7,8-PentaCDF und 3, 3',4,4', 5-PentaCB (Studien-Nummer C96022)

Diese beiden qualitativ sehr guten Studien sind über die NTP-website einsehbar. Das NTP vertritt die Politik der „open source“, die externen Wissenschaftlern das Herunterladen, die Analyse und Verwertung aller Daten ermöglicht.

#### **3.1.8.1 Vergleich von TCDD und TEF in Gemischen**

In beiden Studien wurden Gruppen von 81 weiblichen Ratten gegenüber 10, 22, 46 oder 100 ng TEQ/kg · d (in Studie A gegenüber TCDD, in Studie B gegenüber dem Gemisch) in Maisöl/Aceton (99:1) per Schlundsonde (2,5 ml/kg) an 5 d/w bis zu 105 Wochen exponiert. Die Kontrollgruppen von ebenfalls 81 weiblichen Tieren erhielten nur das Maisöl/Aceton-Vehikel verabreicht. Tiergruppen von je 10 Tieren wurden nach 14, 31 oder 53 Wochen untersucht.

Die Studie mit dem Substanzgemisch wurde unter dem Aspekt der Dosis-Additivität von dioxinartigen Substanzen konzipiert, wobei alle drei Klassen der im TEF-Konzept berücksichtigten chlorierten Arylkohlenwasserstoffe enthalten waren. Das Gemisch bestand aus TCDD, PentaCDF und PCB126 in gleichen TEQ-Verhältnissen (1:1:1). Die Verbindungen wurden als potenteste Vertreter der PCDD, PCDF und koplanaren

PCB ausgewählt. Ausgehend von durchschnittlichen Gehalten in humanen Geweben repräsentieren diese drei Vertreter ca. 48 % der TEQ-Belastung des menschlichen Körpers (Nakao et al., 2005).

Die zur Bestimmung der Dosen verwendeten TEF für TCDD, PentaCDF und PCB126 waren 1,0; 0,5 (1998, WHO-TEF) und 0,1 (Van den Berg et al., 2006). Im Folgenden wird dieses Gemisch als TEF-Gemisch bezeichnet. Da in diesem Gemisch gleiche TEF-basierte Dosisverhältnisse von TCDD, PentaCDF und PCB126 vorlagen, kann erwartet werden, dass es äquipotent zu einer entsprechenden Menge von TCDD als Einzelsubstanz sein sollte.

10 ng TEQ/kg: 3,3 ng/kg TCDD, 6,6 ng/kg PentaCDF und 33,3 ng/kg PCB126

22 ng TEQ/kg: 7,3 ng/kg TCDD, 14,5 ng/kg PentaCDF und 73,3 ng/kg PCB126

46 ng TEQ/kg: 15,2 ng/kg TCDD, 30,4 ng/kg PentaCDF und 153 ng/kg PCB126

100 ng TEQ/kg: 33 ng/kg TCDD, 66 ng/kg PentaCDF und 333 ng/kg PCB126.

Beim Vergleich der Körpergewichtsdaten zeigte sich in die beiden Studien eine klare dosisabhängige Abnahme des Körpergewichts (siehe Abbildung 3-4).

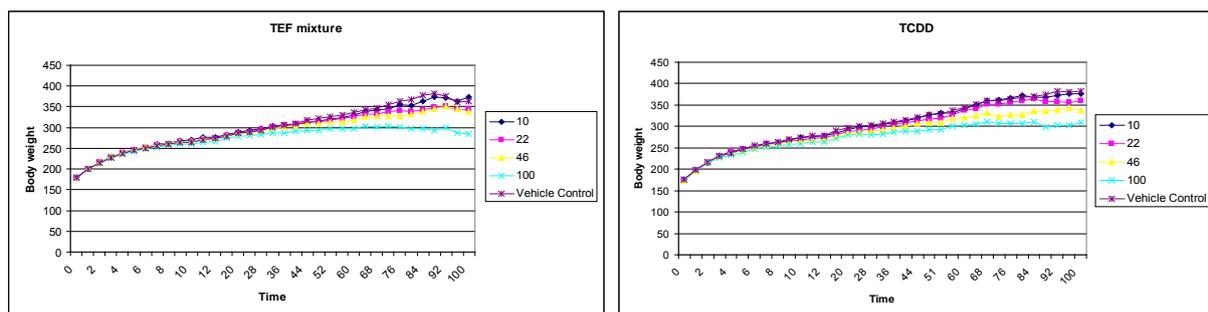


Abbildung 3-4: Dosisabhängige Reduktion der Körpergewichte über 105 Wochen in den NTP-Studien mit TCDD oder TEF-Gemisch-Exposition

Entsprechend dem TEF-Konzept sollte das TEF-Gemisch die gleiche Körpergewichtsreduktion bewirken wie TCDD. Aus diesem Grund verglichen wir bei jeder Dosisgruppe die Effekte zwischen TEF-Gemisch und TCDD. Bei nahezu jedem Zeit- und Dosispunkt verursachte das TEF-Gemisch einen gleichen Verlust an Gewichtszuwachs wie TCDD (siehe Abbildung 3-5). Dieser Befund bestätigt das TEF-Konzept.

Lediglich bei den letzten zwei Studienwochen der höchsten Dosisgruppe konnten wir einen etwas höheren Gewichtsverlust bei dem TEF-Gemisch beobachten.

Abbildung 3-5: Vergleich der Körpergewichtsentwicklung zwischen TCDD und TEF-Gemisch-Exposition bei gleichen TEQ-Werten

Weiterhin ist ein gleichartiger Trend beim Vergleich von Organgewichten (Basis: 5 Organe) ersichtlich. Wir verglichen die Abnahme der relativen Organgewichte für das TEF-Gemisch und TCDD. Wie bereits berichtet, wurden diese Daten zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 14, 31 und 53) erhoben. Das TEF-Gemisch verursachte eine Gewichtsminde rung bei den Organen Milz, Lunge, Niere, Ovarien und Leber, welche der in der TCDD-Studie vergleichbar war. Jedoch zeigte sich beim Vergleich der beiden Studien für das Organgewicht des sechsten betrachteten Organs, des Thymus, ein unterschiedlicher adverser Effekt. Hier waren in Woche 14 keine wesentlichen Unterschiede ersichtlich, in Woche 31 war eine Tendenz zu einem stärkeren Effekt bei TCDD zu beobachten, in Woche 53 trat eine wesentlich stärkere Gewichtsminde rung bei dem TEF-Gemisch im Vergleich zu TCDD auf (siehe Abbildung 3-6). Wir beobachteten, dass die Abnahme des Thymusgewichts mit dem Ausmaß der CYP1A1-Induktion korrelierte:

Abbildung 3-6: Vergleich der Organgewichtsentwicklung von Milz, Lunge, Niere, Ovarien, Leber und Schilddrüse zwischen TCDD und TEF-Gemisch-Exposition

Zur Ermittlung der CYP1A1-Induktion wurde die Aktivität der CYP1A1-assoziierten 7-Ethoxyresorufin-O-Demethylase (EROD) in Woche 14, 31 und 53 bestimmt. Abbildung 3-7 zeigt die EROD (CYP1A1)-Aktivität der Leber. Speziell in Woche 53 verursachte das TEF-Gemisch eine deutlich stärkere CYP1A1-Induktion als TCDD. Bei Vergleich der Induktionsmuster in beiden Studien fanden wir, dass sie gut mit dem Muster der Gewichtsminderung des Thymus übereinstimmen. In Woche 14 verursachte das TEF-Gemisch eine gleich hohe CYP1A1-Induktion und Thymusgewichtsminderung wie TCDD. In Woche 31 hatten die TCDD-exponierten Tiere leicht höhere Spiegel an CYP1A1 und leicht verstärkte Gewichtsminderung des Thymus. In Woche 53 zeigte sich beim TEF-Gemisch im Vergleich zu TCDD ein deutlicher Anstieg des CYP1A1-Spiegels als auch der Thymusgewichtsabnahme.

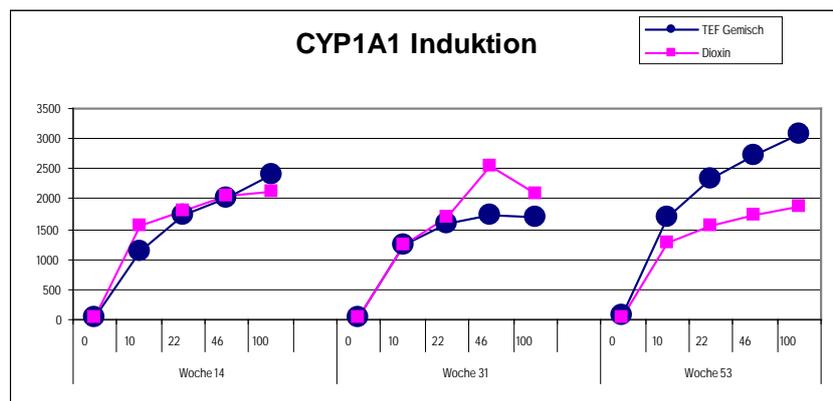


Abbildung 3-7: CYP1A1-Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie mit TCDD oder TEF-Gemisch

Da dies lediglich eine Analyse von NTP-Daten ist, kann über mögliche Ursachen für diese Zusammenhänge nur spekuliert werden. Wir vermuten, dass zwischen Woche 31 und 53 eine zunehmende Menge an neuen Metaboliten gebildet und akkumuliert wird. Diese neuen Metabolite steigern den CYP1A1-Spiegel über zwei mögliche Pfade:

A: Die neu gebildeten Metabolite inhibieren ein Enzym, welches für den CYP1A1-Abbau verantwortlich ist, was zu einer Anhebung des Spiegels an CYP1A1 führt. Dieses Phänomen ist aus Hepatozyten-Zellkulturen bekannt (Hockin und Paine, 1983).

B: Die neu gebildeten Metabolite könnten eine „Superinduktion“ von CYP1A1-Protein induzieren (Teifeld et al., 1989; Lusska et al., 1992). Die Arbeiten von Lusska und Mitarbeitern und auch anderen lassen vermuten, dass das CYP1A1-Gen einen Regelmechanismus zur Vermeidung einer Überexpression besitzt (Lusska et al., 1992; Ou und Ramos, 1995). Ein hierfür postulierter Mechanismus ist ein Ah-Rezeptor-Abbauprozess (Ma und Baldwin, 2002). Falls diese Metabolite den Abbauweg des Ah-Rezeptors inhibieren, kann eine „Superinduktion“ von CYP1A1 resultieren.

Wir glauben, dass hierbei die Bildung eines neuen, hochaffinen Ah-Rezeptor-agonisten unwahrscheinlich ist. Üblicherweise führt der Metabolismus von dioxinartigen Substanzen zu Epoxiden oder Hydroxiden und/oder zu Dehalogenierung. Diese Metabolite sind üblicherweise voluminöser und/oder besitzen eine höhere Oberflächenpolarität. Beides sind kritische Eigenschaften für Ah-Rezeptoragonisten.

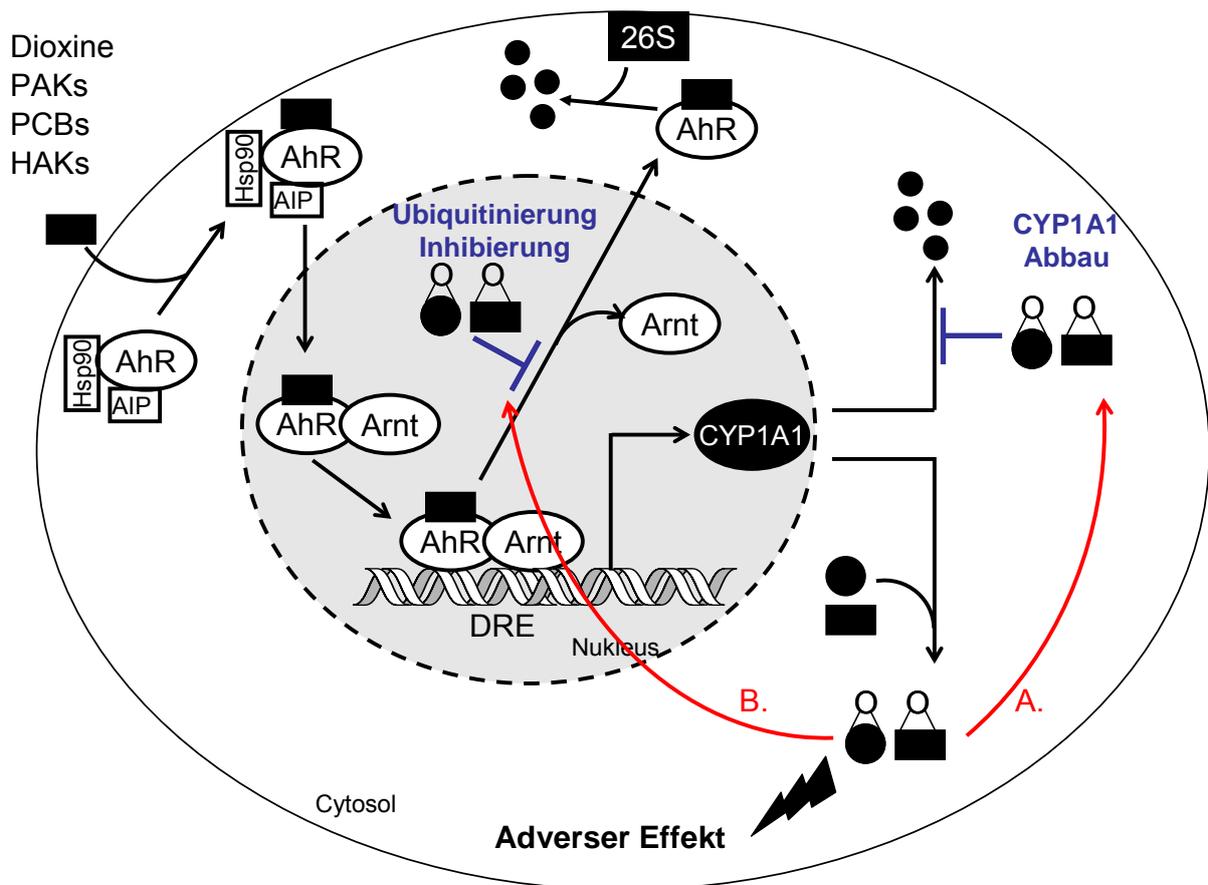


Abbildung 3-8: Mögliche Mechanismen der Wirkungen des TEF-Gemischs: A ) CYP1A1-Abbau b) Inhibition der Ubiquitinierung

Der plötzliche Anstieg der CYP1A1-Spiegel in der Studie mit dem TEF-Gemisch erfordert eine weitere Ursachenforschung. Nach den biochemischen Zusammenhängen gemäß Abbildung 3-8 wäre es denkbar, dass TEQ-Vorhersagen durch die Einbeziehung von „Korrekturfaktoren“ verbessert werden können, welche die Wirkungspfade A oder B berücksichtigen.

### 3.1.8.2 CYP1A1- Inhibitoren – gegenläufige Wirkung

Zur Manifestation der toxischen Eigenschaften von Benzo[a]pyren muss es unter Bildung des vermuteten Kanzerogens Benzo[a]pyrenhydrodiolepoxid (BPDE) metabolisch aktiviert werden. Dieser elektrophile Metabolit bildet DNA-Addukte, welche möglicherweise über eine p38-Kinase apoptotisch wirken (p38-Kinase ist bei Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt) (Allen et al., 2006). Studien, bei denen das CYP1A1-Gen ausgeschaltet wurde (knock-out), zeigten keine toxischen Effekte von BaP (Incardona et al., 2006). Dieser Mechanismus ist gut erforscht und wird bei der Ableitung von TEF-Werten genutzt (auch bei PAH werden die Toxizitäten verschiedener Vertreter mittels eines TEQ-Konzepts im Bezug auf die Referenzsubstanz BaP abgeschätzt). Allerdings fanden Vogelbein et al. in Sedimentproben aus einem PAH-kontaminierten Fluss neben dem Ah-Rezeptoragonisten BaP (11%) auch den CYP1A1-Inhibitor Fluoranthen (26%) (Vogelbein und Unger, 2003), ebenfalls in

PAH. Da BaP über CYP1A1 bioaktiviert wird, würde eine TEQ-Vorhersage unter Nichtberücksichtigung des CYP1A1-Inhibitors Fluoranthen zu falschen Ergebnissen führen. Die Studie berichtet keine detaillierten Messungen, jedoch würden wir postulieren, dass diese Probe eine geringere Toxizität als BaP alleine aufweisen sollte. Die Abbildung 3-9 verdeutlicht die Gesamtsituation.

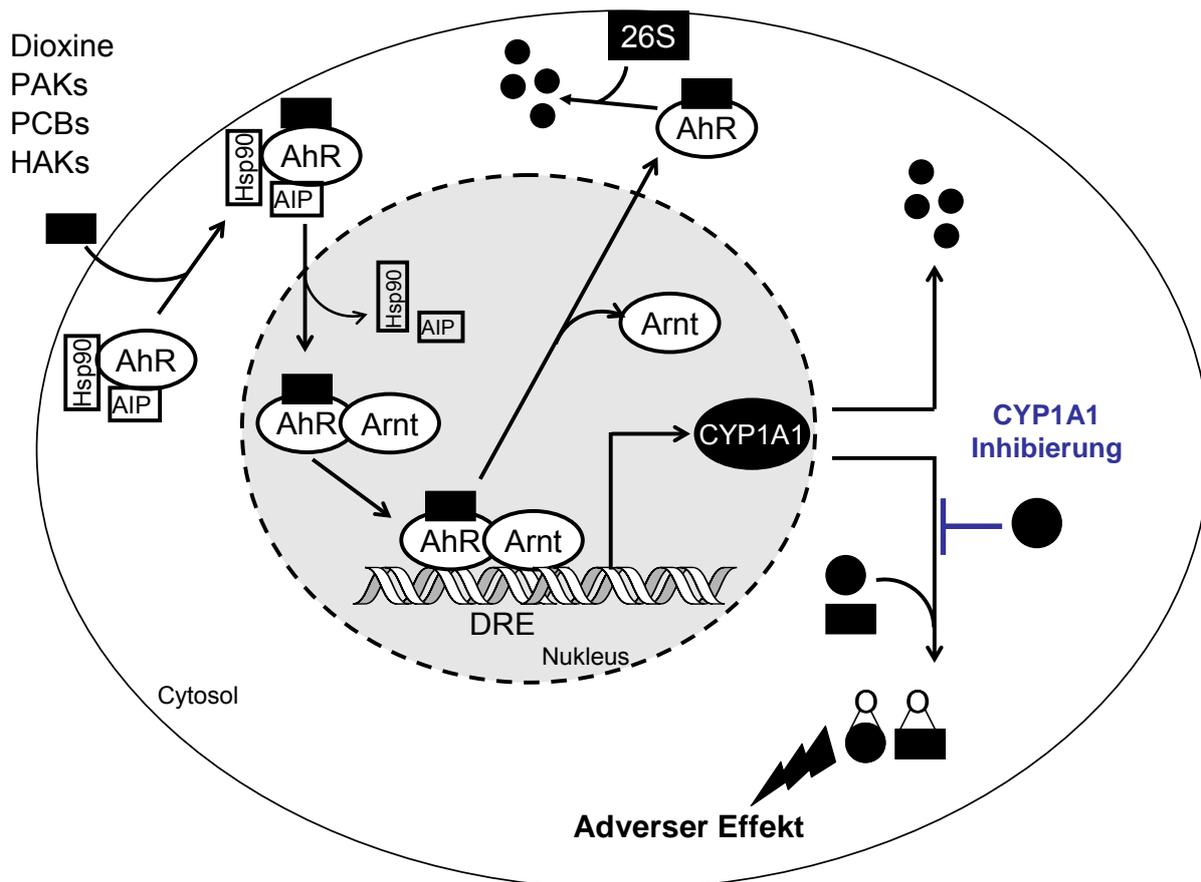


Abbildung 3-9: Mögliche Mechanismen der Wirkung von CYP1A1-Inhibitoren

### 3.1.9 Schlussfolgerungen

Das bekannteste Beispiel, in dem biochemisch-mechanistische Erkenntnisse für die Bewertung von Kombinationswirkungen regulatorisch bereits umgesetzt sind, sind die „Toxizitätsäquivalente“ bei Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen. Hier spielen Interaktionen von Fremdstoffen mit dem intrazellulären Ah-Rezeptor (Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor) die zentrale Rolle. Es kann gezeigt werden, dass tatsächlich bei verschiedenen Gemischen von (z.B.) Tetrachlordibenzodioxin, Pentachlordibenzofuran und Polychloriertem Biphenyl 126 die Wirkungen sehr gut mit den Toxizitätsäquivalenten korrelieren. Eine genauere Analyse zeigt aber, dass in Stoffgemischen, die mit dem Ah-Rezeptor interagieren, auch Wirkungen auftreten

können, die im Widerspruch zu einer einfachen linearen Korrelation stehen. Zum Beispiel

- können über die Wechselwirkung mit dem Ah-Rezeptor Metabolite gebildet werden, die den üblichen Ah-rezeptor-vermittelten Mechanismus inhibieren (wahrscheinlich durch Inhibition eines Cytochrom-Enzymabbaus oder durch Überexpression dieses Cytochroms),
- können unter den miteinander nah verwandten „polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen“ (PAK) gleichzeitig Rezeptoragonisten (wie Benzo(a)pyren) und Antagonisten (wie Fluoranthen) im Gemisch enthalten sein, so dass bei kombinierter Einwirkung bisher nicht genau quantifizierbare Folgen mit widersprüchlicher Wirkungsrichtung trotz gleichem Mechanismus zu berücksichtigen wären.

Diese Beispiele zeigen somit, dass die – grundsätzlich für sich korrekte – Beobachtung eines bestimmten Wirkmechanismus („interagiert mit Ah-Rezeptor“) nicht völlig ausreicht, um quantitative Vorhersagen zur Wirkstärke bei kombinierter Einwirkung mit hinreichender Sicherheit treffen zu können.

Neben der Grundannahme von Ah-Rezeptor-vermittelter Toxizität durch TCDD und dioxinähnliche Substanzen erfordern komplexe Gemische weitere Faktoren zur Ermittlung der TEQ des Gemisches, welche die metabolische Bildung von Metaboliten berücksichtigen. Diese Metabolite können A) CYP1A1-abbauende Enzyme inhibieren; B) eine „Superinduktion“ von CYP1A1 bewirken und/ oder C) die CYP1A1-Inhibition verursachen, wobei entweder die dioxinähnliche Substanzen oder andere Chemikalien in komplexeren Gemischen (nicht-Kongener-Gemische) verantwortlich sein können. Bei A und B resultiert eine höhere CYP1A1-Aktivität, bei C eine Abnahme der CYP1A1-Aktivität (siehe Abbildung 3-10).

Die Gesamtwirkung dieser Faktoren wird stark vom gemessenen Endpunkt beeinflusst und variiert von Gemisch zu Gemisch. Die Wirkung der Komponenten hängt von der Bedeutung des CYP1A1 im jeweiligen Gemisch ab.

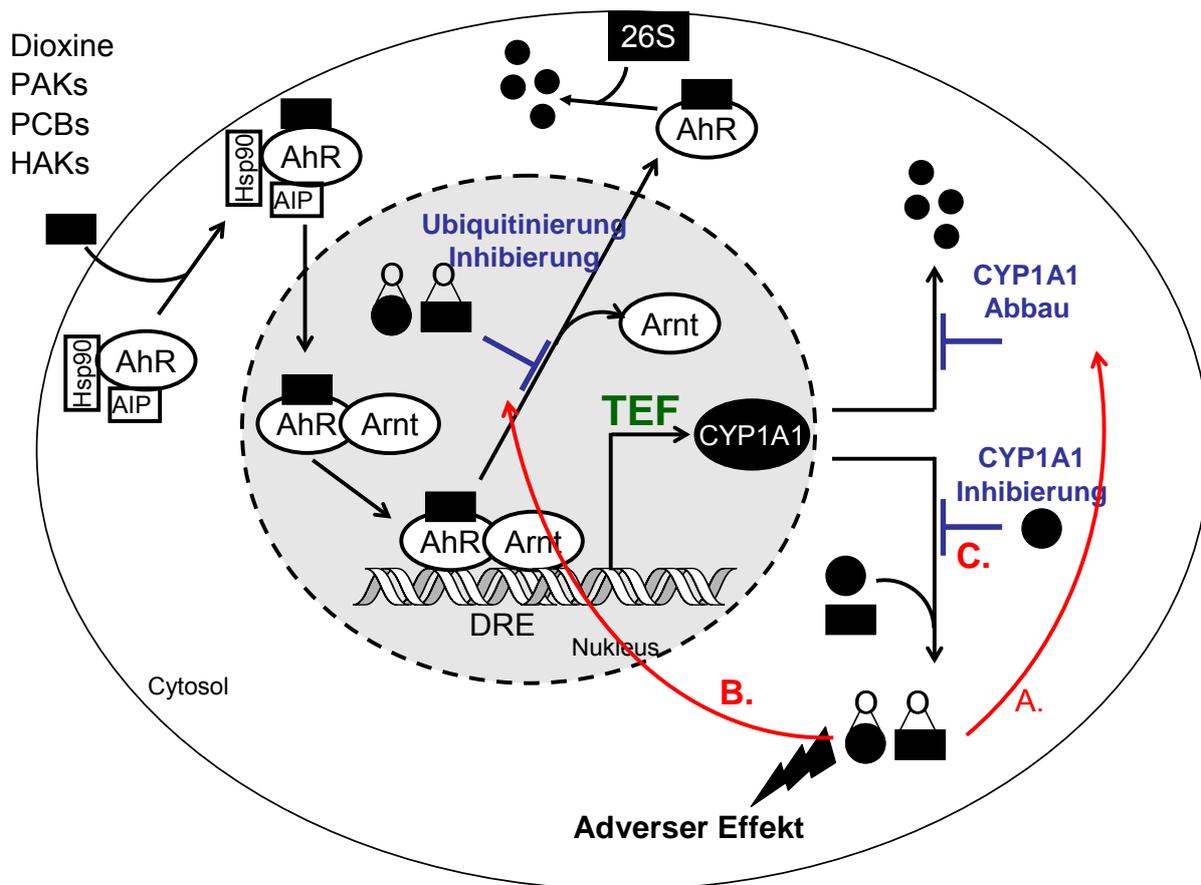


Abbildung 3-10: Mögliche Korrekturfaktoren zur Ermittlung der TEQ von Gemischen

### 3.2 Bestimmung der Wirkung komplexer Gemische hinsichtlich kardiovasulärer Krankheiten

Ein neuerer toxikologischer Endpunkt, dem in klassischen Tests wenig Bedeutung geschenkt wird, ist die Artherosklerose. Artherosklerose wird mit der Wirkung einiger Einzelsubstanzen, aber vor allem in Verbindung mit Exposition gegenüber umweltrelevanten Substanzgemischen in Verbindung gebracht.

Im folgenden Abschnitt betrachten wir Wirkungen und mechanistische Hintergründe für das Auftreten von Artherosklerose und versuchen, Schlussfolgerungen für die Charakteristika von Gemischen zu ziehen, die solche Erkrankungen erzeugen.

#### 3.2.1 Luftverschmutzung und kardiovaskuläre Krankheiten

Kardiovaskuläre Krankheiten (CVD) stellen in den westlichen Ländern die Haupttodesursache dar. Etwa 17,5 Millionen Personen sterben jährlich an CVD, dies sind 30% aller Todesfälle. 7,6 Millionen davon gehen auf Herzinfarkte zurück, 5,7 Millionen auf Hirninfarkte. Bei dem jetzigen Trend wird 2015 ein Anstieg auf 20 Millionen Tote erwartet. Herzinfarkte und Gehirninfarkte werden überwiegend durch Gefäßblockaden verursacht. Meist werden diese durch die Ablagerung von Fetten an der Innen-

wand der Adern ausgelöst. Die resultierende Verengung und Verhärtung der Blutgefäße wird auch als Atherosklerose bezeichnet.

Zusätzlich zu den bekannten Risikofaktoren wie Serumlipidspiegel, Rauchen, Bluthochdruck, Alter, Geschlecht, erbliche Belastung, Bewegungsmangel und Ernährung wurde neuerdings auch die Luftverschmutzung als weiterer wichtiger Risikofaktor für CVD erkannt (Glantz Stanton, 2002). Die stärksten und konsistentesten Zusammenhänge zwischen Luftverschmutzung und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität ergaben sich für den Parameter Staubbelastung (particulate matter, PM) (Brook et al., 2002; Gold et al., 2000; Ibaldo-Mulli et al., 2001; Peters et al., 1999; Pope et al., 1999).

PM ist ein heterogenes Gemisch von festen und flüssigen Aerosolen, deren Größe und chemische Zusammensetzung ort- und zeitabhängig variiert (Brook et al., 2004). Als besonders relevante PM-Fraktion wird PM<sub>2,5</sub> beschrieben. Unter den zahlreichen Quellen von PM sind u.a. zu nennen: Kraftfahrzeugemissionen, Reifenabrieb und Aufwirbelung von Straßenstaub, Energieerzeugung und andere industrielle Verbrennungsvorgänge, Schmelzen und andere Metallverarbeitungen, Landwirtschaft, Baugewerbe und Emissionen von Holzfeuerung in Haushalten. Obwohl eine Vielzahl von Chemikalien in PM nachgewiesen wurde, sind die am häufigsten anzutreffenden Komponenten Nitrate, Sulfate, elementarer Kohlenstoff und organische Verbindungen (z.B. PAK), biologische Komponenten (z.B. Enzyme und Zellfragmente) und zahlreiche Metallverbindungen (z.B. Eisen, Kupfer, Nickel, Zink und Vanadium) (Wiseman und Zereini, 2009).

### **3.2.2 Gesundheitliche Effekte von PM bei Langzeitexposition des Menschen**

Die „Harvard Six Cities“ Studie (Dockery et al., 1993) war die erste große prospektive Kohortenstudie, die adverse Effekte längerfristiger Exposition gegenüber PM aufzeigte. Die Autoren wiesen nach, dass chronische PM-Exposition direkt mit kardiovaskulärer Mortalität korreliert ist. Im Hinblick auf die Luftschadstoffe zeigten PM<sub>2,5</sub> und Sulfat die stärksten Assoziationen.

Nach Hook und Mitarbeitern war in einer Kohorte von 5000 Erwachsenen die Mortalitätsrate in Straßennähe um den Faktor 1,95 (95% CI 1,09-3,52) höher als die in verkehrsarmen Bereichen (Hook et al., 2002). Eine Korrelation ergab sich auch für PM und kardiovaskulärer Gesamtmortalität: pro Zunahme um 10 µg PM/m<sup>3</sup> stieg das Mortalitätsrisiko um 8%. Die größte Zunahme wurde für ischämische Herzkrankheiten ermittelt (RR 1,18, 95% CI 1,14-1,23), welche auch den größten Teil der Todesfälle ausmachten (Pope et al., 2004).

### **3.2.3 Biochemische Mechanismen der CVD**

Zur Erklärung der wahrscheinlichen biochemischen Mechanismen der CVD beschreiben wir die Oxidations-Modifikations-Hypothese der Atherosklerose. Hierbei wird vermutet, dass eine Oxidation des in der Blutbahn zirkulierenden „low-density Lipoprotein“ (Lipoprotein niedriger Dichte, LDL) eine zentrale Rolle in frühen Phasen der Atherosklerose spielt (Inoue et al., 2001; Kataoka et al., 1999; Suzuki et al., 2002). Zwei der Hauptwirkungen der Wirkungspfade der oxidativen Modifikation sind Vasodilatation und Apoptose (Cipollone et al., 2007). Zunächst beschreiben wir die

Aktivierung dieser Wirkungspfade innerhalb endothelialer Zellen. Im Weiteren wird die Oxidations-Modifikations-Hypothese detaillierter beschrieben.

### 3.2.3.1 Vasodilatation

Die Vasodilatation regelt über eine Entspannung der glatten Muskulatur den Innendurchmesser der Blutgefäße. Erweiterung der Gefäße führt zu Blutdruckabfall. Exogene Vasodilatoren, z.B. Umweltschadstoffe, können die homöostatische Regulation durch endogene Vasodilatoren stören und Funktionen der Endothelzellen beeinträchtigen. Im Folgenden werden zwei gut untersuchte Signalwege der Vasodilatation beschrieben: 1) Vasodilatation über das EDHF-System („endothel-derived hyperpolarization factor“), 2) Vasodilatation über Stickstoffmonoxid.

#### EDHF-System:

Der Nuclear Faktor 1 (NF-1) spielt eine zentrale Rolle bei der Cytochrom P 450 (CYP450)-Transkription in Endothelzellen (Morel und Barouki, 1998; Ryan und Sigmund, 2004; vgl. Schritt (1) in Abbildung 3-11). CYP450 fungiert in Endothelzellen als Epoxygenase. CYP450 katalysiert die Oxidation von Arachidonsäure (Borlakoglu et al., 1991; Rifkind et al., 1995), was zur Bildung von epoxidierten Fettsäuren wie der 11,12-Epoxy-Eicosatriensäure führt (Schritt (2)). Diese epoxidierte Fettsäure ist ein „endothelial-derived hyperpolarization“ Faktor (EDHF) (Milstien und Katusic, 1999; Ryan und Sigmund, 2004). Das EDHF-System umfasst Substanzen und/oder elektrische Signale, welche im Endothel gebildet und daraus freigesetzt werden. Ihre Wirkungsweise besteht darin, dass die glatte Gefäßmuskulatur hyperpolarisiert wird, was zur Entspannung der Zellen und Dilatation der Blutgefäße führt (Luksha et al., 2009; Schritt (3)). Störungen am NF-1 können somit zu einer Störung in der CYP450-Expression und somit indirekt in der Aktivierung des EDHF-Systems bewirken und somit in die Vasodilatation eingreifen (vgl. Abbildung 3-11).

#### Stickstoffmonoxid:

Die endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS) ist ein Enzym, das in Blutgefäßen durch die Reaktion eines terminalen N-Atoms von Arginin in Gegenwart von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Stickstoffmonoxid (NO) produziert. NO ist ein wichtiger Faktor bei der Signalleitung zur Vasodilatation (Schritte (4), (5) in Abbildung 3-11).

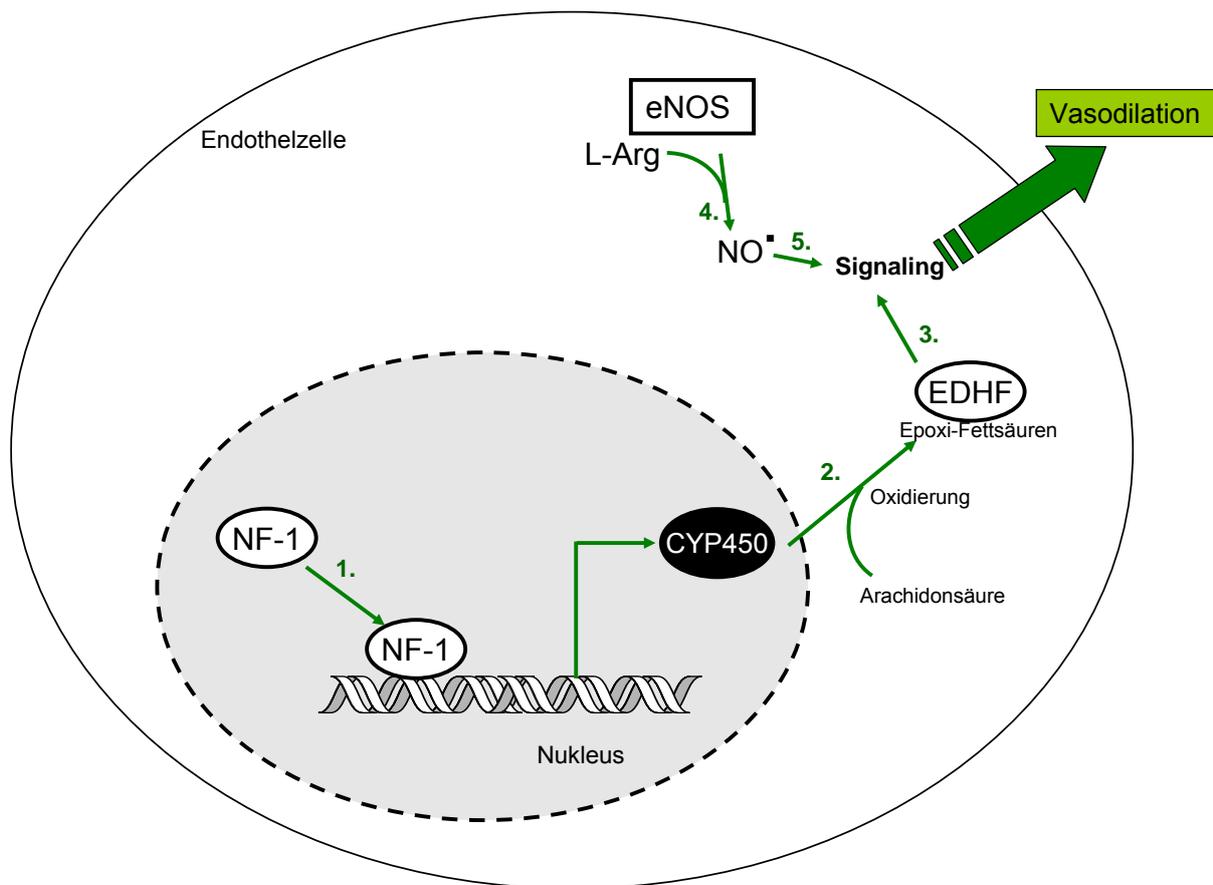


Abbildung 3-11: Molekulare Signalwege der Vasodilatation im Endothel

Für alle folgenden Abbildungen: Physiologische Signalketten sind grün markiert, durch Störung von Fremdstoffen erzeugte, unerwünschte Signalketten werden rot hervorgehoben

### 3.2.3.2 Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen (Base excision repair)

Das Ausschneiden von Basen der DNA ("base excision repair", BER) ist ein zellulärer Mechanismus zur Reparatur von schadhafter DNA während des Zellzyklus. Reparatur fehlerhafter DNA-Sequenzen verhindert die Vererbung von Mutationen und/oder DNA-Brüchen während der Replikation (Culotta und Koshland, 1994; Demple und Harrison, 1994; Moller und Wallin, 1998; Satoh und Lindahl, 1994).

Einzelne DNA-Basen können z.B. durch Deaminierung, Oxidation oder Alkylierung chemisch mutiert werden, was zu falscher Basenpaarung und in der Folge zu Mutationen führt. Das Ausschneiden von Nukleotiden entfernt diese mutierten Basen aus der DNA-Helix, um Mutation, DNA-Fragmentierung und in deren Folge eine geänderte Genexpression oder den Zelltod zu verhindern (Chen et al., 2000).

Eine der Hauptenzyme des BER-Systems ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1; E.C. 2.4.2.30). PARP-1 ist eines der im Zellkern am häufigsten vorkommenden Proteine (Shall und de Murcia, 2000). Während der DNA-Reparatur wird PARP-1 an die beschädigte Stelle der DNA geführt, um die Integrität des Genoms wieder herzustellen (Bouchard et al., 2003; Huber et al., 2004; Nguewa et al., 2005;

Virag und Szabo, 2002). Als Reaktion auf DNA-Brüche katalysiert PARP-1 über eine  $\text{NAD}^+$ -Spaltung die Synthese von linearen oder verzweigten ADP-Ribose-Homopolymeren an nukleären Proteinen (de Murcia und de Murcia, 1994; Lautier et al., 1993; Ruf et al., 1998). In gewissem Umfang ermöglicht diese Reaktion auch BER (de Murcia und de Murcia, 1994). Bei schwerer DNA-Schädigung erfolgt ein intensiver Metabolismus von  $\text{NAD}^+$  zur Bildung der Homopolymere, was zu einer massiven  $\text{NAD}^+$ -Depletion führen kann (Berger et al., 1995). Bei starker  $\text{NAD}^+$ -Depletion versagt die BER und es findet Apoptose oder Nekrose der Zelle statt (siehe Abbildung 3-12) (Pieper et al., 1999; Yu et al., 2002).

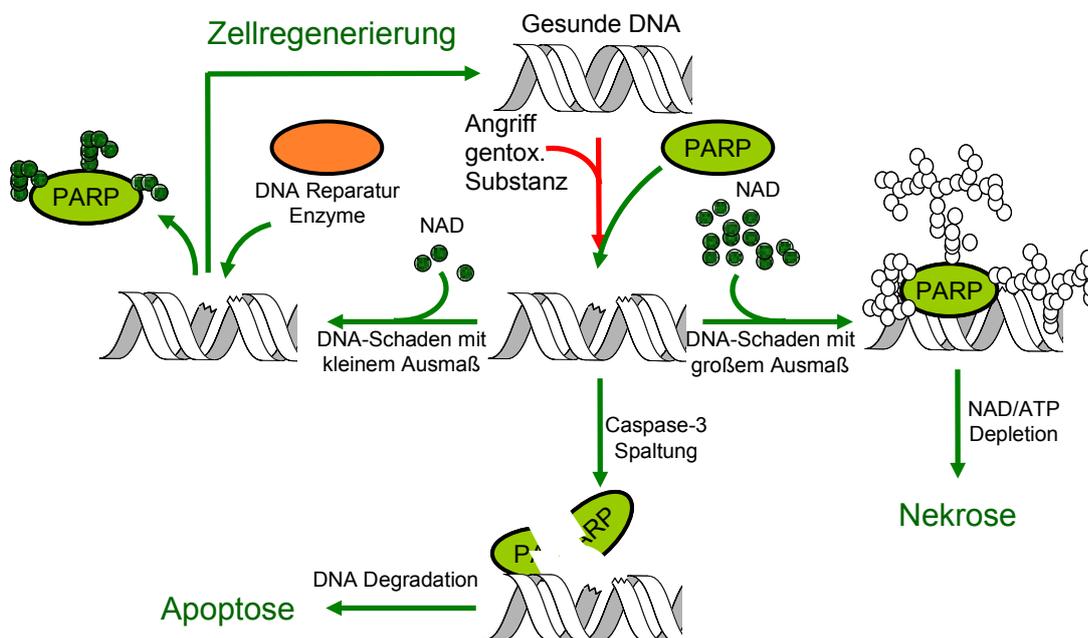


Abbildung 3-12: Schematische Darstellung zur Rolle des Enzyms PARP-1 bei der Reparatur von DNA-Schäden

### 3.2.3.3 Der oxLDL-Signalweg

Die nachfolgende Abbildung 3-13 zeigt einige der Hauptmechanismen der Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies. Die Nummerierung der Vorgänge entspricht dem in der Abbildung vorgestellten Schritt.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (6) bewirkt die Oxidation von LDL zu oxLDL (Thum und Borlak, 2008), welches in einer Rückkopplung eine erhöhte Produktion von ROS auslöst (7). Die Aufnahme von oxLDL ins Endothel findet durch Interaktion mit dem oxLDL-Rezeptor (LOX-1) (7) statt. Bei diesem handelt es sich um ein Glykoprotein, welches an der Zelloberfläche lokalisiert ist und für die Bindung und Internalisierung des oxLDL in die Endothelzelle verantwortlich ist (Aoyama et al., 1999; Mehta und Li, 1998; Moriwaki et al., 1998). In atherosklerotischen Läsionen findet man üblicherweise eine Überexpression von LOX-1 (Kataoka et al., 1999; Sawamura et al., 1997). Eine der Wirkungen des internalisierten oxLDL ist die Akti-

vierung von NADPH (8) (Thum und Borlak, 2004), welche wiederum eine ROS-Produktion zur Folge hat (9) (Cominacini et al., 1998; Heinloth et al., 2000; Rueckenschloss et al., 2001; Ryan und Sigmund, 2004; Sawamura et al., 1997; Wingler et al., 2001). Die Zunahme der ROS-Produktion in atherosklerotischen Arterien übersteigt die Entgiftungskapazität endogener Antioxidanzien bei weitem (Fraley und Tsimikas, 2006).

ROS verursachen Protein- und DNA-Oxidation (Baker und He, 1991; Beckman und Ames, 1997; Chen et al., 2000; Fraga und Tappel, 1988; Martinet et al., 2002). Proteinoxidation führt zu einer Vielzahl von Folgeprodukten, von denen Proteincarbonyle am besten untersucht sind (Martinet et al., 2002). Die Carbonylierung von Proteinen ist eine irreversible, nichtenzymatische Reaktion, bei der Carbonylgruppen an verschiedenen Stellen der Proteinmoleküle eingebaut werden. Die Oxidation von Proteinen führt zu Konformationsänderungen, welche partielle oder totale Inaktivierung (Stadtman und Levine, 2003), Fehlfaltungen (Dalle-Donne et al., 2006) oder in Extremfällen sogar Proteolyse zur Folge haben können. (Grune et al., 2004). Die Oxidation von NF- $\kappa$ B inhibiert die DNA-bindende Eigenschaft des Proteins (10), was zu einer verringerten Transkription der CYP450-Gene wie CYP1A1 führt (Thum und Borlak, 2004). NF- $\kappa$ B enthält 4 Cysteinreste, von denen 3 für die Bindung an DNA verantwortlich sind (Pinkus et al., 1996). Durch Alkylierung oder Oxidation wird diese Bindung inhibiert (Bandyopadhyay und Gronostajski, 1994). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass NF- $\kappa$ B empfindlich auf reaktive Sauerstoffspezies reagiert (Morel und Barouki, 1998). Es wurde gezeigt, dass hohe Spiegel an ROS die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B verhindern (Thum und Borlak, 2004). Durch die in der Folge geringere CYP-Induktion wird das EDHF-Signal (2,3) abgeschwächt (Fissithaler et al., 1999; Thum und Borlak, 2004).

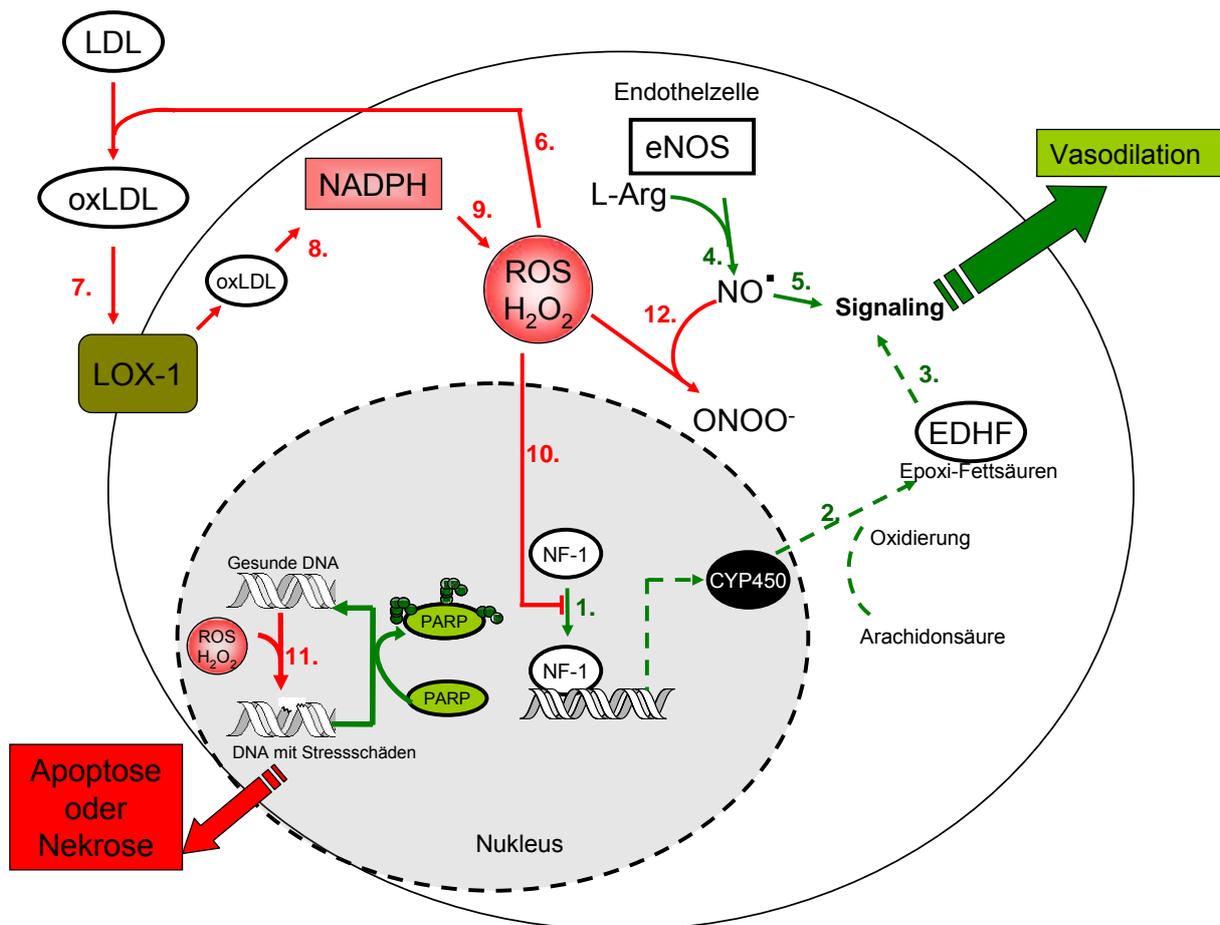


Abbildung 3-13: Molekulare Signalwege zur Gefäßerweiterung und zur LDL-Oxidierung sowie zur Apoptose und Nekrose durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zur Nummerierung vgl. auch Text

NO kann radikalisch durch ROS zu Peroxynitrit (12) oxidiert werden, welches für das Endothelium eine stark wirkende Noxe ist (Morel und Barouki, 1998). Zudem ist weniger NO in der Zelle verfügbar und somit ist auch der zweite Signalweg, welcher zur Vasodilatation führt, negativ beeinflusst (Thum und Borlak, 2004).

In menschlichen atherosklerotischen Plaques wurden ebenfalls erhöhte Raten an oxidativen DNA-Schäden beobachtet (11) (Martinet et al., 2002). Unter diesen ist die Bildung von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) eine der häufigsten Läsionen der Säuger-DNA (Beckman und Ames, 1997). In Plaques wurden im Vergleich zu nicht-atherosklerotischen Arterien oft erhöhte Mengen an 8-oxo-dG nachgewiesen (Martinet et al., 2002). 8-oxo-dG wirkt stark mutagen und führt zu vermehrtem Auftreten spontaner G-C → A-T Mutationen in reparaturdefizienten Zellen (Wang et al., 1998).

### 3.2.4 Toxische Wirkungen der Substanzen in luftbürtigen Staubpartikeln

In diesem Abschnitt beschreiben wir zunächst biochemische Mechanismen der häufig in PM gefundenen Chemikalien in Endothelzellen. Diese Substanzen stammen von Dieselabgaspartikeln (DEP), Zigarettenrauch und Benzinverbrennung ab, welche die Hauptvertreter der in komplexen Gemischen von in PM gefundenen Substanzen darstellen. Anschließend werden deren Wechselwirkungen untereinander und die verschiedenen möglichen Effekte auf die endotheliale Toxizität betrachtet.

#### 3.2.4.1 ROS-Produktion und oxidativer Stress

Mehrere Studien zeigten, dass PM wie DEP Kohlenwasserstoffe und Übergangsmetalle enthält, welche bei den zyklischen Redoxreaktionen auslösen können. Diese Redoxreaktionen erzeugen entweder direkt ROS und damit oxidativen Stress (Li et al., 2003; Gong et al., 2007; Hirano et al., 2003; Sun et al., 2005; Xiao et al., 2003), oder es findet eine direkte Oxidation von LDL zu oxLDL statt (Ikeda et al., 1995).

In einer kürzlich durchgeführten *in vivo*-Studie wurden mittels *in situ* Chemilumineszenz das schnelle Auftreten von oxidativem Stress in Herz und Lunge nachgewiesen. Eine 2 h Exposition gegenüber konzentrierten DEP verdoppelte die ROS-Produktion in Rattenherz und -Lunge (Gurgueira et al., 2002). Weitere Studien berichten ähnliche Ergebnisse (Dellinger et al., 2001).

Kohlenwasserstoffe können während ihres Metabolismus durch die Bildung reaktiver Chinone Redoxreaktionen induzieren und somit oxidative Schäden hervorrufen (Greife und Warshawsky, 1993; Singh et al., 2008). Redoxreaktionen starten mit der einwertigen Reduktion von Xenobiotika durch Enzyme wie die Xanthinoxidase unter Bildung eines radikalischen Intermediats. Dieses Radikal überträgt sein Elektron auf molekularen Sauerstoff, was zur Bildung von  $O_2^-$  und der Ausgangsverbindung führt. Somit kann ein Einzelmolekül eine Vielzahl von Sauerstoffradikalen erzeugen. Weiterhin findet dieser Prozess unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten der Zelle wie NADPH statt, was Konsequenzen für andere metabolische Prozesse haben kann (Bachur et al., 1978; Kappus und Sies, 1981; Thor et al., 1982).

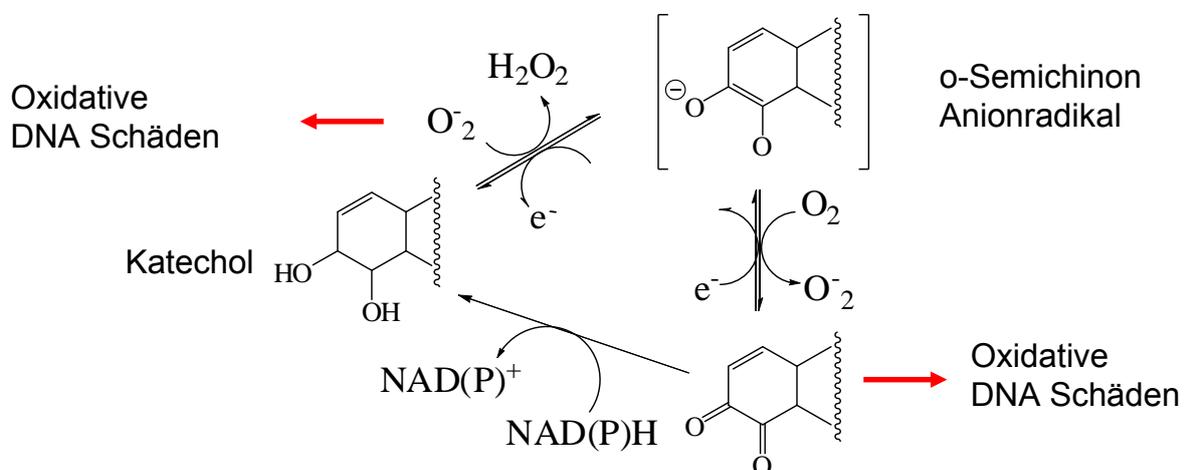


Abbildung 3-14: ROS-erzeugende Redoxreaktionen von Chinonen

### 3.2.4.2 Chinone und Inhibition von eNOS

Wie bereits berichtet, wird NO durch eNOS synthetisiert. Dieses Gas wird in Endothelzellen zur Regulation des Blutdrucks gebildet, es inhibiert die Thrombozytenaggregation sowie die Migrationsaktivität von glatten Muskelzellen und schützt vor Ischämie (Moncada et al., 1991; Nathan, 1992; Schmidt und Walter, 1994). Eine verminderte Bildung von NO durch eNOS-Inhibitoren oder durch Störung der Expression der eNOS-codierenden Gene bewirkt Vasokonstriktion und damit eine Steigerung des Blutdrucks (Huang et al., 1995; Rees et al., 1989; Sander et al., 1999). Der Mechanismus der eNOS-katalysierten NO-Bildung ist entscheidend für die inhibitorische Wirkung von DEP auf die NO-Produktion.

Bei der eNOS-katalysierten Reaktion werden vom NADPH stammende Elektronen auf die Reduktasedomäne von eNOS und weiter auf die Oxidasedomäne des Enzyms übertragen (Alderton et al., 2001). Dort findet im aktiven Zentrum eine Wechselwirkung mit dem Häm-Eisen und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, ein wesentlicher Kofaktor der eNOS-Synthese) statt (Knowles und Moncada, 1994; Marietta, 1994; Nathan und Xie, 1994), was die Reaktion von Sauerstoff mit L-Arginin katalysiert, welche NO erzeugt (siehe Abbildung 3-15).

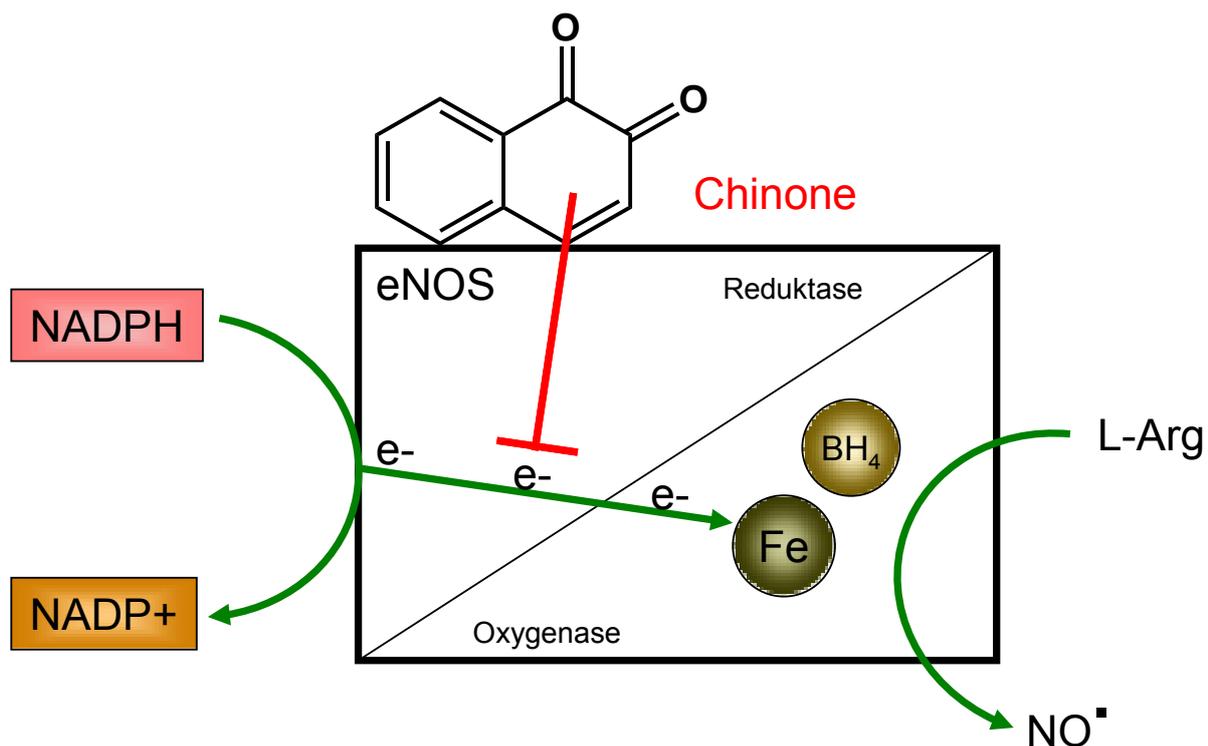


Abbildung 3-15: Schematische Darstellung der Inhibition der katalytischen Funktion von eNOS durch Chinone (Alderton et al., 2001).

Redoxreaktive Kohlenwasserstoffe in DEP enthalten Chinone: Aclarubicin, Menadion, 9, 10-Phenanthrachinon und 1,2-Naphthochinon (Cho et al., 2004; Schuetzle, 1983; Schuetzle et al., 1981). Diese Chinone können als potente Elektronenakzeptoren fungieren, wobei sie den Elektronentransfer in der eNOS stören (vgl. Abbildung 3-15). *In vivo* und *in vitro* Studien stützen die Hypothese, dass die redoxreaktiven Chinone in PM die Aktivität der eNOS und damit den NO-abhängigen

vaskulären Tonus beeinträchtigen (Kumagai et al., 2001). In *in vitro*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass Chinone wie 1,2-Naphthochinon (IC<sub>50</sub>: 1,4 µM) und 9,10-Phenanthrachinon (IC<sub>50</sub>: 0,6 µM) potente Inhibitoren der eNOS sind (Sun et al., 2006). Die intraperitoneale Injektion von 9,10-Phenanthrachinon (0,36 mmol/kg) in Ratten bewirkte einen Anstieg des Blutdruckes auf das 1,4-fache des Kontrollwertes. Unter diesen Bedingungen reduzierte sich der Plasmaspiegel stabiler NO-Metabolite, das Nitrit/Nitrat-Verhältnis, in den behandelten Tieren auf 68% des Kontrollwertes (Kumagai et al., 2001).

### 3.2.4.3 PM und Ah-Rezeptoraktivierung

In Abschnitt 3.1.3 wurde die Aktivierung der Transkription der CYP1A1-Induktion durch den Ah-Rezeptor beschrieben. Nach *in vitro* Studien enthalten PM Ah-Rezeptoragonisten (Hamers et al., 2000; Mason, 1994). Hamers et al. benutzten zur Ermittlung der Ah-rezeptorvermittelten Aktivität einer Reihe von PM-Proben den DR-CALUX-Assay (Hamers et al., 2000). Nach 6 h Exposition der Zellen gegenüber den PM-enthaltenden Proben fanden sie partikelgebundene Ah-Rezeptoragonisten in Konzentrationen von 0,6-11 pg Dioxin-CEQ/m<sup>3</sup> (die Testergebnisse wurden als Dioxin-Calux-Äquivalente pro m<sup>3</sup> = Dioxin-CEQ/m<sup>3</sup> angegeben), nach 48 h Exposition <0,3-0,8 pg Dioxin-CEQ/m<sup>3</sup>.

*In vitro* Studien zeigten, dass DEP den Ah-Rezeptor aktivieren und die Induktion der Transkription von Reportergenen bewirken kann, welche durch die DNA-reaktiven Elemente des Ah-Rezeptors reguliert werden (Mason, 1994; Meek, 1998; Wenger et al., 2008; Westerholm et al., 2001). Dieselpartikelfilter verminderten die Konzentrationen an Ah-Rezeptoragonisten um bis zu 90% (Wenger et al., 2008). Somit ist der Betrieb von Dieselmotoren ohne Partikelfilter eine relevante Quelle atmosphärischer Ah-Rezeptoragonisten.

Wenn wir die Ah-rezeptorvermittelte Induktion von CYP1A1 den adversen Wirkungen von PM und DEP zuordnen, ist anzumerken, dass die CYP1A1-Induktion auch benefiziell wirken kann (vgl. Abbildung 3-16, Schritt 13). Eine Zunahme der Menge an CYP1A1 kann zum Metabolismus der Arachidonsäure mit Bildung von epoxidierten Fettsäuren beitragen, wenn gleichzeitig die NF-1-Aktivität inhibiert ist (Abbildung 3-16, Schritt 14). Eine weitere Beobachtung ist, dass während der NO-Signalweg über verschiedene Mechanismen durch PM-Exposition beeinträchtigt werden kann, das EDHF-Signal davon weitgehend unbeeinflusst bleiben sollte. Aus diesem Grund können bei Untersuchungen von Effekten der PM auf Endothelzellen je nach spezifischer Zusammensetzung der PM-Gemische stark voneinander abweichende Ergebnisse erhalten werden. Hohe Konzentrationen an Ah-Rezeptoragonisten mit niedrigen Konzentrationen an Chinonen könnten sich bei Messungen der vasodilatatorischen Wirkung in einer niedrigen Toxizität niederschlagen. Dagegen würden niedrige Konzentrationen an Ah-Rezeptoragonisten im Verbund mit hohen Konzentrationen an Chinonen eine stärkere toxische Wirkung zeigen, was eine bislang nicht erkannte Gefährdung durch die Verwendung von Dieselpartikelfiltern bedingen würde.



auslösen. Gleichzeitige Gabe von PARP-1-Inhibitoren mit Temozolomid verbesserte in *in vivo* und *in vitro* Studien den antikanzerogenen Effekt von Temozolomid um den Faktor 3 und führte zur Wiederherstellung der Sensitivität der Zellen gegenüber Temozolomid (Calabrese et al., 2004; Curtin et al., 2004; Delaney et al., 2000; Tentori et al., 2001a, b).

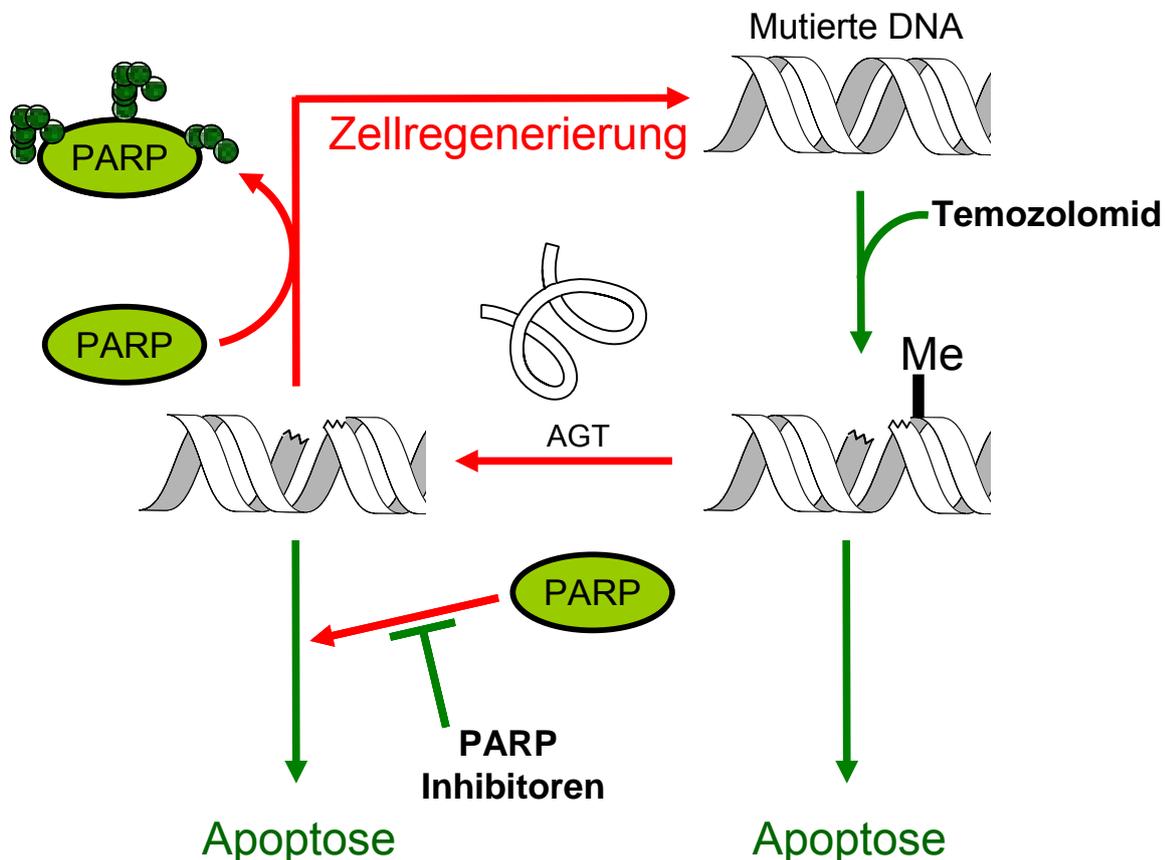


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Temozolomid und PARP-1-Inhibitoren

#### 3.2.4.4.2 Bifunktionelle alkylierende Substanzen

1,3-Butadien (BD) ist eine der im Zigarettenrauch am häufigsten vertretenen gasförmigen Substanzen (ca. 400 µg pro Zigarette) und eine Komponente von Abgasen von Benzinmotoren (Huang und Tang, 2008; Kashiwakura et al., 2009; Yan et al., 2007). Um zu testen, ob BD die Entwicklung von Plaques fördert, wurden White Leghorn-Hähne inhalativ gegenüber 20 ppm BD (6 h/d, 5 d/w, 16 Wochen) exponiert (Penn und Snyder, 1996). Diese Konzentration ist nur ein Fünfzigstel des früheren MAK-Wertes von 1000 ppm (durchschnittliche Exposition an 8 h/d, 40 h/Woche, dieser Wert wurde aber bereits 1983 wegen krebserzeugender Wirkung ausgesetzt). Die Exposition bewirkte einen signifikanten Anstieg von Plaques in der abdominalen Aorta. BD verursachte auch eine beschleunigte Plaqueentwicklung bei Inhalation von Tabakrauch in Junghähnen (Penn und Snyder, 1993). Im Gegensatz zu den Effekten durch BD wurden nach inhalativer Exposition von Acrolein (Penn et al., 2001) oder

Kohlenmonoxid (Penn et al., 1983), zwei weiteren Hauptkomponenten von Zigarettenrauch, keine schnellere Plaquebildung beobachtet. Weiterhin waren die Blutwerte von Nikotin und Kohlenmonoxid bei Passivrauchern relativ niedrig (Benowitz, 2003). So ist BD bei dem Testsystem Hühner der einzige Bestandteil von Zigarettenrauch, der ohne weitere Beteiligung und bereits bei Konzentrationen ähnlich denen wie im Zigarettenrauch ursächlich für das Entstehen von CVD ist (Penn und Snyder, 1996; 2007).

Der Zusammenhang zwischen CVD und BD-Exposition wurde von Yang auch in Säugern gezeigt (Yang, 2004). Bei 1-4-wöchiger Exposition von Mäusen gegenüber 12 ppm BD wurden bereits nach der ersten Woche Schädigungen der mitochondrialen DNA in kardiovaskulärem Gewebe nachgewiesen.

Durch Verstoffwechslung entsteht aus BD der bifunktionelle alkylierende Metabolit Butadiendiepoxid (BDO), dessen zwei Epoxidgruppen mit 2 Nucleophilen wie SH-Gruppen von Cysteinen reagieren können (siehe Abbildung 3-18). Die AGT ist ein konstitutiv exprimiertes Protein, welches die Zelle gegen genotoxische Wirkungen infolge von DNA-Alkylierung schützt (Margison et al., 2003; Margison und Santibanez-Koref, 2002; Pegg, 2000; Tubbs et al., 2007). In Gegenwart von BDO als bifunktionelles alkylierendes Agens (BFA) kann jedoch ein Komplex aus AGT und DNA entstehen, welcher sogar die genotoxischen Wirkungen verstärken kann (Loeber et al., 2006). Nach einer Initialreaktion von BDO mit der DNA wird die AGT aktiv, um das DNA-Addukt von BDO zu eliminieren. Jedoch reagiert aufgrund der Bifunktionalität von BDO eine der SH-Gruppen von AGT über einen nucleophilen Angriff irreversibel mit BDO, was zur Bildung eines DNA-BDO-AGT-Komplexes führt (siehe Abbildung 3-18; Loeber et al., 2006). Weitere Studien bestätigten, dass dieses „Cross-linking“ des Proteins AGT mit der endothelialen DNA in relevantem Ausmaß zur Toxizität und Mutagenität von BDO beiträgt (Edara et al., 1999; Kalapila et al., 2008; Loecken und Guengerich, 2008; Pegg et al., 1995). Wie bereits in Abbildung 3-17 verdeutlicht, muss AGT von der DNA freigesetzt werden, bevor PARP-1 den BER-Pfad aktivieren kann. Die Situation ist vergleichbar der oben beschriebenen, wo beim Zusammenwirken eines methylierenden Agens und eines PARP-1-Inhibitors eine verstärkte endotheliale Toxizität beobachtet wird. In diesem Fall fungiert BDO als BFA sowohl als methylierendes Agens und PARP-1-Inhibitor, als Folgeunterschied bleibt die Aktivierung des BER-Pfades (siehe Abbildung 3-18).

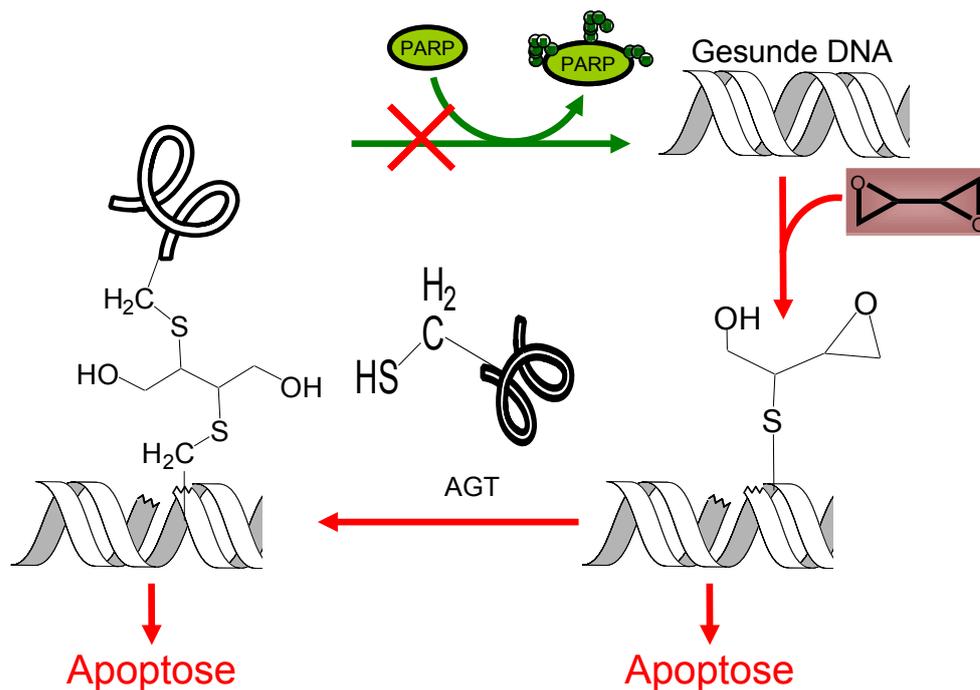


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der Reaktion von BDO mit der DNA und AGT

### 3.2.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel stellen wir die toxischen Wirkmechanismen einiger Gruppen von Chemikalien dar. Komponenten von Feinstaub (PM) aus Diesel- und Benzinmotorabgas sowie aus Zigarettenrauch bewirken schwere Funktionsstörungen des Endothels. Diese PM-Partikel enthalten Metalle, Chinone und andere redoxreaktive Kohlenwasserstoffe, welche ROS erzeugen, LDL oxidieren, die NO-Produktion inhibieren und bereits erzeugtes NO sowie AH-Rezeptoragonisten, (welche die Expression von CYP induzieren) abfangen. Letztlich bilden irreversible DNA-Addukte mit AGT. Abbildung 3-19 zeigt ein mögliches Szenario der komplexen Interaktion zwischen diesen Chemikalien.

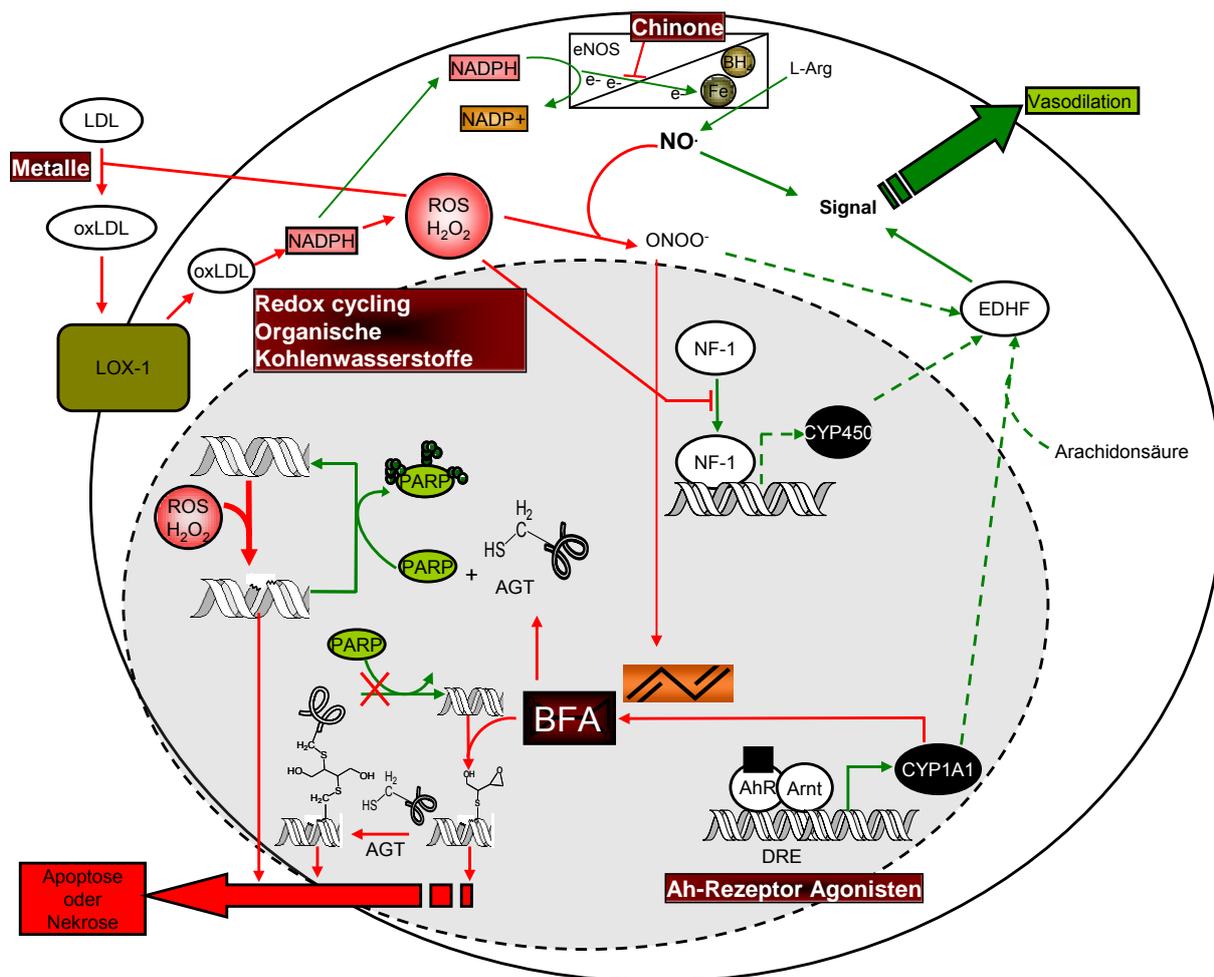


Abbildung 3-19: Molekulare Mechanismen für Vasodilatation, oxLDL und Ah-Rezeptor-Signalwegen sowie der Wechselwirkung von BFA mit der DNA und AGT

Redoxreaktive Kohlenwasserstoffe können ROS erzeugen, welche in der Folge LDL oxidieren. Wie gezeigt wurde, erzeugt oxLDL über eine NADPH-Aktivierung weitere ROS. Jedoch liefert die NADPH-Aktivierung auch zusätzlich Elektronen zur Bildung von NO durch eNOS. Eine vermehrte ROS-Bildung kann die Fähigkeit von Proteinen wie NF-1 zur Bindung an transkriptionsregulatorische Sequenzen der DNA beeinträchtigen. Die wiederum führt zu einer Abnahme von CYP in der Zelle, welches üblicherweise für den EDHF-Signalweg benötigt wird. Vermehrte ROS-Bildung bewirkt eine Inhibition der eNOS oder ein Abfangen von NO unter Bildung von Peroxynitrit. Dieses verursacht zelluläre Schäden und Oxidation von Alkenen wie BD (Yang et al., 1999). Allerdings resultieren auch benefizielle Effekte wie die Oxidation der Arachidonsäure (Balazy, 1994).

In der Gegenwart von BD werden unter CYP-Katalyse BFA erzeugt, was die verfügbare Menge bzw. die Aktivität an aktivem CYP für die Oxidation von Arachidonsäure reduziert. Höhere Konzentrationen an BFA führen zur Zunahme von Apoptose und einer Abschwächung des vasodilatatorischen Signals. In diesen Fällen sind geringere CYP-Aktivitäten vorteilhaft, weil diese die Produktion von BFA unterstützen (obwohl

ein gewisser Spiegel an CYP-Enzymaktivitäten für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen unerlässlich ist). Ohne B-D-Exposition können Ah-Rezeptoragonisten benefizient wirken, da sie das EDHF-Signal verstärken.

Zur Abschätzung der toxischen Wirkungen von PM aus der Umgebungsluft ist es wichtig, dessen Zusammensetzung zu beachten. Wir haben gezeigt, wie die Toxizität von Xenobiotika in Abhängigkeit von der Anwesenheit anderer Chemikalien variieren kann. Die Toxizität komplexer Gemische kann unter Berücksichtigung dreier wichtiger Kategorien abgeschätzt werden.

A. Komponenten eines Gemischs, welche LDL oxidieren, ROS erzeugen, NO abfangen oder die NO-Erzeugung inhibieren können. Diese Gruppe ist am besten untersucht. Üblicherweise können Oxidationsmittel ox LDL und ROS erzeugen und den NO-Spiegel verringern. Die Messung des oxidativen Potenzials eines Gemischs gibt klare Hinweise auf die Toxizität im Hinblick auf CVD.

B. Komponenten eines Gemisches, welche mit Metabolismuspfeilen der Zelle wechselwirken. Abhängig von der Zusammensetzung eines Gemischs kann ein Anstieg der CYP-Aktivität entweder von Vorteil (falls der EDHF-Signalweg relevant ist) oder schädlich sein (wenn BFA erzeugt werden). Eine Testung auf Anwesenheit von BFA ist im Kontext mit der CYP-Aktivität entscheidend für weitere Aktionen, z.B. Ausfiltern auf BFA oder Ah-Rezeptoragonisten.

C. Chemikalien, die die Interaktion von AGT und PARP-1 mit der DNA verhindern (Hemmung der DNA-Bindung). Durch die Störung von Reparaturmechanismen kann die Toxizität eines Gemischs verstärkt werden. Die Bestimmung von PARP-1- und AGT-Inhibitoren kann einen Hinweis auf die Reaktionsfähigkeit der Zelle gegenüber toxischen Wirkungen dieses Gemisches geben.

Die Toxizität eines Gemischs kann durch das Verständnis der Zugehörigkeit seiner Komponenten zu diesen drei Kategorien besser abgeschätzt werden.

### **3.3 Vorhersagbarkeit quantitativer biochemischer Veränderungen bei Gemischen**

Gleichzeitig auf einen Organismus einwirkende Schadstoffe können Kombinationswirkungen verursachen, welche sich in gegenseitiger Wirkungsverstärkung oder –abschwächung äußern können. Dabei können Kombinationswirkungen hinsichtlich eines bestimmten Endpunktes (evtl. über verschiedene Mechanismen) oder eines gemeinsamen Wirkmechanismus, welcher auch verschiedene Endpunkte affizieren kann, unterschieden werden. In diesem Abschnitt werden anhand ausgewählter Beispiele Interaktionen im Bezug auf einzelne Wirkungsmechanismen erörtert und ihre Auswirkungen auf endpunktbezogene Toxizitäten diskutiert.

#### **3.3.1 Beispiel 1: CYP-abhängige Enzymveränderungen in der Mäuseleber bei verschiedenen Pestizidgemischen**

Fenarimol, Vinclozolin und Acephat sind weit verbreitete Pestizide, die als Einzelstoffe bewertet sind. Alle drei Substanzen sind ein Substrat für Enzyme der P450-Enzymfamilie und induzieren zugleich CYP. Dies hat zur Folge, dass auch CYP-abhängige Enzyme vermehrt oder vermindert exprimiert werden können. Beispiels-

weise führen die genannten Pestizide zur vermehrten Hydroxylierung von Testosteron in der (Mäuse-)leber, was an der erhöhten Testosteron-Hydroxylaseaktivität abgelesen werden kann (Lini et al., 1998; Saponone et al., 2005). Eine Studie von Canistro et al. (2008) prüfte nun, in welcher Weise bestimmte Gemische der genannten Pestizide zur CYP-Induktion einerseits, zur NADPH-Reduktase Aktivität andererseits und weiteren zu verschiedenen CYP-abhängigen Enzymaktivitätsveränderungen führen.

Die Pestizide wurden in Dosierungen, wie in Tabelle 3-1 angegeben, als Gemisch i.p. in Maisöl, über Einmalexpositionen sowie über Dreimalexposition (drei Folgetage) an männliche Swiss-Albino CD1 Mäuse verabreicht. Aus Parallelstudien war zudem die Einzelstoffauswirkung bekannt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung Pestizidgemische zur Testung von Kombinationswirkung

Gemisch	Dosierung
Gemisch 1	125 mg/kg Körpergewicht Acephat + 150 mg/kg Körpergewicht Fenarimol
Gemisch 2	150 mg/kg Körpergewicht Fenarimol + 625 mg/kg Vinclozolin Körpergewicht
Gemisch 3	125 mg/kg Körpergewicht Acephat + 625 mg/kg Vinclozolin Körpergewicht
Gemisch 4	125 mg/kg Körpergewicht Acephat + 150 mg/kg Körpergewicht Fenarimol + 625 mg/kg Vinclozolin Körpergewicht
Verabreichung: i.p., in Maisöl, 1xExposition sowie 3xExposition (drei Folgetage) an männliche Swiss-Albino CD1 Mäuse	

Tabelle 2-1 enthält einige Beispiele für die veränderten Enzymaktivitäten (*ex vivo*) in Leberzellen.

Tabelle 3-2: Expression von cytochrom P-450-verbundenen Monooxygenasen (auch speziell Testosteron-Hydroxylasen) in hepatischen subzellulären Präparaten von mit verschiedenen Pestizidgemischen behandelten CD1-Mäusen

	Kontrolle (nur Maisöl)	Gemisch 1		Gemisch 2		Gemisch 3		Gemisch 4	
		1d	3d	1d	3d	1d	3d	1d	3d
Cytochrom P450 (nmol/mg)	0,48 ±0,03	0,76 ±0,06**	0,95 ±0,06**	0,42 ±0,02	0,75 ±0,05**	0,83 ±0,07**	1,35 ±0,03**	0,71 ±0,07**	1,03 ±0,02**
NADPH-cytochrom-c-Reduktase (nmol/mg/min)	31,78 ±2,27	36,98 ±3,09*	36,24 ±4,45**	37,50 ±2,94*	44,95 ±3,35**	39,94 ±3,31**	56,56 ±2,92**	36,72 ±0,47**	52,05 ±1,96**
p-Nitrophenol Hydroxylase (nmol/mg/min) (CYP2E1)	0,37 ±0,02	0,59 ±0,06**	0,66 ±0,01**	0,66 ±0,02**	0,79 ±0,03**	0,74 ±0,05**	0,4 ±0,03**	0,46 ±0,06*	1,37 ±0,01**
Ethoxyresorufin-O-deethylase (pmol/mg/min) (CYP1A1)	15,95 ±1,20	16,22 ±0,99	20,94 ±2,24**	21,37 ±1,56**	27,36 ±0,33**	22,64 ±0,26**	34,13 ±2,30**	14,02 ±0,30**	21,79 ±2,24**
2 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (pmol/mg/min)	9,31 ±1,96	6,25 ±0,03*	13,10 ±0,04*	1,28 ±0,11**	0,73 ±0,07**	6,62 ±2,34*	6,65 ±1,36*	10,19 ±0,21	10,05 ±0,57
6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (pmol/mg/min)	1,07 ±0,16	2,49 ±0,40**	2,40 ±0,11**	4,57 ±1,02**	2,93 ±0,72**	5,26 ±0,29**	7,82 ±0,38**	1,29 ±0,04	1,72 ±0,09**
2 $\beta$ -Hydroxytestosteron (pmol/mg/min)	67 ±0,16	169,94 ±8,14**	200,09 ±16,4**	358,32 ±26,7**	242,10 ±19,5**	363,37 ±17,7**	519,79 ±22,0**	206,57 ±13,6**	290,54 ±17,6**

Werte geben geom. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach 6 unabhängigen Versuchen mit 6 Mäusen an.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und ihren Kontrollen nach Wilcoxon's Rangmethode)

Die Werte ergeben kein klares Bild und erlauben es nicht, eine antagonistische, synergistische oder additive Wirkung der Substanzen im Gemisch vorauszusagen.

So bedeutet z.B. die einmalige Verabreichung von Fenarimol+Vinclozolin (Gemisch 2) eine deutliche Herabsetzung von 2 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (auf 1,28 pmol/mg/min) gegenüber der Kontrolle (9,31 pmol/mg/min), während eine Verabreichung des Gemischs 4 (Fenarimol+Vinclozolin+Acephat) zu einer nichtsignifikanten Erhöhung des 2 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (auf 10,19 pmol/mg/min) führte. Gemisch 3 (Acephat+Vinclozolin) führte wiederum zu einer leichten und signifikanten Reduzierung von 2 $\alpha$ -Hydroxytestosteron in den Leberzellen (auf 6,62 pmol/mg/min). Die Autoren berichten dazu, dass bei Einzelstoffverabreichung von Fenarimol die Hydroxylierung in Position 2 $\alpha$  bis zu etwa 78-fach zugenommen habe (Paolini et al., 1996).

Die Enzyminduktionen werden jeweils mit relevanten toxikologischen Endpunkten in Verbindung gebracht.

Das Beispiel verdeutlicht, wie möglicherweise fragwürdig die Aussagen von Einzelstofftestungen für das Zusammenwirken von Gemischen und wie unsicher eine Vorhersage von einem Gemisch auf andere Gemische übertragbar sein kann. Eventuell trägt die relativ hohe Dosierung zu diesem Befund bei und dieser würde im niedrigeren Dosisbereich anders ausfallen, andererseits zeigt das Beispiel auf dem derzeitigen Erkenntnisstand, wie vorsichtig mit mechanistisch begründeten Ergebnissen und ihrer Vorhersagekraft für Gemische umgegangen werden muss.

### 3.3.2 Beispiel 2: Hormonwirksame Substanzen

Ghisari und Bonfeld-Jorgensen (2009) untersuchten die Effekte verschiedener Weichmacher (Phthalate und Adipate) sowie strukturell verwandter substituierter Phenole, welche als Komponenten von Kunststoffen oder als Zusatzstoffe in Kunststoffen vorkommen. Weiterhin wurden noch phenolische Komponenten von Herbiziden getestet.

Diese Substanzen haben wegen ihres Vorkommens in Lebensmittelverpackungen und/oder Kosmetika hohe Relevanz für die Exposition des Menschen.

Mit Blick auf Kombinationswirkungen wurden getestet:

Weichmacher: Benzylbutylphthalat (BBP)

Phenole: Bisphenol A (BPA), n-Nonylphenol (nNP), 4-tert-Octylphenol (tOP), 4-Chlor-3-methylphenol (CMP), und Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzol).

Die Studie basiert auf Befunden zu hormonähnliche Wirkungen bei den genannten Substanzen (östrogene Wirkungen, Beeinflussung der Schilddrüsenhormonregulation).

#### a) Interaktion mit Östrogenrezeptor

Die xenobiotische Beeinflussung des östrogenen Systems wird mit Auswirkungen auf die Entwicklung von Geweben wie Nervensystem und Herz in Zusammenhang gebracht, vor allem aber mit nachteiligen Effekten auf die Entwicklung reproduktiver Organe bei Mann und Frau. Hierbei wird auf molekularer Ebene über eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor die Transkription von zahlreichen Genen verändert und so die Gewebsdifferenzierung und Zellproliferation gestört. Dies kann zu verminderter Fertilität, Entwicklungsstörungen sowie (endokrin gesteuerter) Tumorbildung führen.

#### b) Regulation von Schilddrüsenhormonen

Die Regulierung der Schilddrüsenhormone wird vor allem durch eine Reduktion der Spiegel an zirkulierenden Hormonen beeinträchtigt, welche vor allem bei der Entwicklung und Reifung des Gehirns eine zentrale Rolle spielen, aber auch bei Wachstum und Differenzierung anderer Gewebe.

In der Studie wurde die Wirksamkeit der genannten Chemikalien hinsichtlich der zwei genannten Mechanismen in *in vitro* Systemen getestet, wobei auch Kombinationswirkungen (jeweils Mischungen von 6 Komponenten) untersucht wurden.

Als Testsystem für die östrogene Wirkung wurde eine gentechnisch veränderte humane Brustzelllinie (MVLN-Zellen) verwendet, welche von der Linie MCF-7 abgeleitet

wurde. Sie enthält ein östrogensensitives Element, gekoppelt mit einem Luciferase-Gen, was zur Ermittlung der Aktivierung des Östrogenrezeptors dient. Bestimmt wurde die Affinität der Substanzen zum Rezeptor mit und ohne endogenem Liganden (17 $\beta$ -Östradiol (E2) bei halbmaximal wirksamer Konzentration (EC50)).

Das Testsystem für die Thyroidhormonbeeinflussung war eine hormonsensitive Rattenzelllinie GH3, welche durch Veränderung der Proliferationsrate reagiert. Die Aktivität der Substanzen wurde ohne und in Gegenwart von Triiodthyronin (T3, EC50) getestet.

Zunächst wurden für die Einzelstoffe getestet und der jeweilige NOAEC, LOAEC und EC50 (TH-abhängiger Proliferationseffekt; ER Transaktivierung) mit und ohne natürlichem Hormonzusatz (T3-EC50; E2-EC50) bestimmt.

Im Experiment zu Kombinationswirkungen wurden dann die oben genannten Verbindungen eingesetzt, und ebenfalls die NOAEC, LOAEC und EC50 ermittelt. Bei im Assay unwirksamen Substanzen wurden willkürlich Konzentrationen von  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  und  $10^{-5}$  M gewählt.

Die experimentellen Ergebnisse wurden mit einem additiven berechneten Effekt und mit dem Isobolenergebnis (Summeneffekt bei 1) verglichen.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

### **a) Östrogene Wirkung**

Im Kombinationsexperiment war bei dem Test mit den jeweiligen NOAEC der Einzelsubstanzen keine östrogene Aktivität ersichtlich (ohne oder mit E2), während bei den LOAEC und EC50 die Aktivierung signifikant höher im Vergleich zu den Effekten der Einzelverbindungen war (bei den LOAEC in Höhe des erwarteten Effektes, bei der EC50 höher, als nach den Daten der Einzelverbindungen bei Additivitätsunterstellung zu erwarten). Bei Konzentrationen, bei der die Einzelverbindungen den Rezeptor aktivieren, tritt also eine Wirkungsverstärkung etwa in der Höhe eines additiven Effekts ein (leicht synergistisch: Isobolenkoeffizient 0,9). Unter Anwesenheit von E2 wurde ebenfalls ein leicht überadditiver Effekt beobachtet (Isobolenkoeffizient 0,8).

Anhand dieses Assays ergibt sich, dass 3 der getesteten Substanzen eine östrogene Wirkung besitzen, mit einer um mehrere Größenordnungen geringeren Affinität als der von E2. Simultane Exposition in Höhe der NOAEC der Einzelverbindungen führte noch nicht zu einer Rezeptoraktivierung, jedoch bei individuellen Effektkonzentrationen (LOAEC) zu einer Wirkungsverstärkung. Die Abweichung gegenüber der Additivität war gering.

### **b) Test auf Beeinflussung der Schilddrüsenhormonspiegel**

Im Kombinationswirkungs-Experiment ohne Gegenwart von T3 war die Wirkung des Gemischs bei den NOAEC der Einzelsubstanzen gleich der der Einzelkomponenten. Bei den LOAEC war ein stimulierender Effekt auf die Proliferation zu beobachten, jedoch war der Wert geringer als die maximalen Werte der wirksamsten Einzelsubstanzen (ebenso bei dem Test mit EC50-Werten). Die beobachteten Effektkonzentrationen waren höher als nach mathematischer Modellierung erwartet. Das bedeutet, dass die Wirkungen des Gemischs unteradditiv waren, also antagonistische Einflüsse

se zum Tragen kamen (Isobolenkoeffizient 1,6 beim LOAEL und 5,6 (deutlich unteradditiv) beim EC50).

Im Kompetitionsexperiment mit T3 war bei dem Test mit LOAEC eine signifikante überadditive Wirkungsverstärkung zu beobachten (erheblicher Einfluss von T3-EC50), bei EC50 der 6 Substanzen zeigte sich keine Verstärkung trotz Anwesenheit von T3-EC50, aber erste Anzeichen von Zytotoxizität. Es wird vermutet, dass Interferenzen bei den aktivierenden Enzymen (e.g. CYP) bestehen, die für die Unteradditivität verantwortlich sein könnte, wobei hier keine quantitative Analyse erfolgte. Auch die Toxizität beeinträchtigt das Wachstum der G H3-Zellen. Ferner scheint n-Nonylphenol einen inhibitorischen Effekt auf T3-induziertes Zellwachstum bei G H3-Zellen auszuüben (Ghisari und Bonfeld-Jorgensen, 2005), was von den Autoren als starker gegenläufiger Effekt interpretiert wird. Ferner lässt sich aus diesem Experiment ableiten, dass die Komponenten des Gemischs im Niedrigkonzentrationsbereich bei Konkurrenz um die T3-Bindungsstellen untereinander eine unteradditive Gesamtwirkung haben, die Gegenwart von T3 in Höhe der EC50 aber eine (geringer als additive) Wirkungsverstärkung bedeutet.

### Schlussfolgerung

Das Beispiel beinhaltet die gleichen Grenzen, die auch endpunktbezogene Tests ohne Einbezug des Mechanismus bei Untersuchungen zu Kombinationswirkungen aufweisen. Die einfache Erkenntnis, dass der Östrogenrezeptor am Wirkungsmechanismus beteiligt ist, ergibt noch keine hinreichende Eingrenzung der Art der Wirkungsbeeinflussung durch mehrere Komponenten. Die Annahme einer additiven Wirkung scheint bei dem vorliegenden Gemisch dem Zusammenwirken hinreichend Rechnung zu tragen, die Autoren der Studie weisen aber auch darauf hin, dass auch synergistische und antagonistische Wirkungen bei endokrin aktiven Substanzen gefunden wurden. Die komplexen Einflüsse auf das T3-induzierte Zellwachstum (Enzymatische Aktivierung, Konkurrenz um Bindungsstellen, inhibitorische Wirkung einer Einzelsubstanz (n-Nonylphenol), die von ihrer chemischen Strukturverwandtschaft zu t-Oktylphenol bisher nicht vorausgesetzt werden kann) zeigen die Schwierigkeit einer verallgemeinerbaren Vorhersage von Wirkungen komplexer Gemische, auch wenn mechanistische Elemente in die Analyse einbezogen werden.

## 4 Möglichkeiten der Nutzung der Struktur-Wirkungsanalyse zur Erkennung "neuer" toxischer Endpunkte bei Fremdstoffen<sup>7</sup>

### 4.1 Aufgabenstellung

#### 4.1.1 Endpunkte und Moleküle für QSAR-Berechnungen

Für die toxischen Endpunkte a) Neurodegeneration (16 Stoffe der

Abbildung 2-5, Abbildung 2-6, Abbildung 2-8 aus Kapitel 2.1) und b) verzögerte allergische Reaktion (4 Stoffe der Abbildung 2-15 aus Abschnitt 2.2) sollten QSAR-Berechnungen durchgeführt werden. Falls Modelle für diese Endpunkte nicht verfügbar sind, sollten alternativ die Endpunkte Neurotoxizität für Neurodegeneration und Immuntoxizität als Alternative zu verzögerter allergischer Reaktion herangezogen werden. Es sollten je nach Modellverfügbarkeit im gegebenen Rahmen für

- Neurodegeneration oder Neurotoxizität
- verzögerte allergische Reaktion oder Immuntoxizität

mittels QSAR für jeweils einen möglichst großen Teil der oben genannten Moleküle Berechnungen durchgeführt werden. Neben den genannten Endpunkten sollten je nach Ergebnis der zuvor genannten Recherchen und Berechnungen und soweit im gegebenen finanziellen Rahmen möglich ggf. auch andere Eigenschaften und Kriterien wie die Erfüllung der Lipinski Rule of Five, Passage der Blut-Hirn-Schranke, Oberflächenpolarität oder der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log P_{ow}$ ) geprüft bzw. berechnet werden.

#### 4.1.2 Überprüfung der Prognosen

Hierfür waren folgende Punkte zu bearbeiten:

- Überprüfung, ob eine Bestätigung der in o.g. Textauszug aufgeführten Prognosen zur Neurodegeneration und verzögerten allergischen Reaktion mittels QSAR möglich ist.
- Falls zum jeweiligen Endpunkt keine Modelle verfügbar sind, sind als Ersatzendpunkte Neurotoxizität oder Immuntoxizität (s.o.) zu prüfen.
- Wenn keine Prognosen möglich sind, sind die Gründe zu erläutern.

---

<sup>7</sup> Abschnitt 5 wurde im Unterauftrag durch Prof. Dr. Klaus Kümmerer, EDC Chemical Consulting, Martin Luther Straße, 79341 Kenzingen, bearbeitet und hier nur redaktionell durch den Auftragnehmer in das Gesamtgutachten integriert. Das Originalgutachten von Herrn K. Kümmerer ist als Anhang zu diesem Bericht verfügbar.

### 4.1.3 Bewertung biochemischer Parameter als Ähnlichkeitskriterien bei QSAR

Hier waren folgende Punkte zu betrachten:

- Wo spielen diese biochemischen Parameter eine Rolle? Gibt es dafür Beispiele von Modellen/Datenbanken? Und wenn ja, welche?
- Gibt es Beispiele für Stoffe, die über einen ähnlichen Mechanismus wirken, und wo dies im Modell gezeigt werden kann?
- Grenzen und Validierungsaspekte von QSAR-Modellen

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Generelles zur Datenlage und Vorgehensweise

Für die Prädikation der hier relevanten Eigenschaften der vorgegebenen Moleküle wurden die Strukturformeln, um sie elektronisch zur Verfügung zu haben, in den SMILES-Code überführt. Es wurden nicht alle ursprünglich vorgeschlagenen Prädikationen durchgeführt, da nur wenige Modelle und die auch nur bei einzelnen Softwareanwendungen für die Ersatzendpunkte verfügbar waren. Stattdessen wurde die Recherche nach weiterer Software und Modellen zusätzlich zu den ursprünglich hauptsächlich für die Prädikation vorgesehenen wie Leadscope und Multicase hinaus deutlich erweitert, um einen generelleren Überblick über verfügbare Software, Modelle und Moleküleigenschaften zu erhalten.

Soweit möglich wurde zuvor mit den Anbietern geklärt, inwieweit die Moleküle, die hier von Relevanz sind, durch die Anwendungsdomäne der bei kommerziellen Anbietern verfügbaren Modelle abgedeckt sind, um auch verwendbare Ergebnisse zu erhalten. In einem Fall handelt es sich dabei um ein FDA-approved Modell (Leadscope), was zwar einerseits Mehrkosten bedingt, aber eine verbesserte Qualität und Validität der Prädikation ermöglichte. Die Hintergrundinformationen zu den in Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 aufgeführten Molekülen hinsichtlich der Anwendungsdomäne und günstige Konditionen für die Prädikation zu erhalten war aufgrund der langen und guten Zusammenarbeit von EDC mit diesen Anbietern möglich. Weitere Prädikationen erfolgten mit Hilfe öffentlich verfügbarer Software.

Es wurden die  $\log P_{OW}$ -Werte und die Prüfung der Lipinski Rule of Five für alle Verbindungen der Tabelle 4-1 und Tabelle 4-3 berechnet bzw. geprüft oder recherchiert, um die Verwendbarkeit dieser Parameter für die aufgeworfenen Fragestellungen zu prüfen.

### 4.2.2 Struktureigenschaftsbeziehungen

Eine Beziehung zwischen einer pharmakologischen, chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaft eines Moleküls einerseits und seiner chemischen Struktur andererseits, wird Struktureigenschaftsbeziehung genannt. Einfache, bekannte solche Beziehungen spiegeln sich in den Bezeichnungen chemischer Stoffgruppen mit gemeinsamen oder ähnlichen Eigenschaften wider wie z.B. Alkohole, Aldehyde, Aromaten u.a. Werden Struktureigenschaftsbeziehungen für quantitative Aussagen

genutzt, spricht man von Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR)<sup>8</sup>. Manchmal findet man auch den Begriff Quantitative Structure Property Relationship (QSPR), wenn es sich um die Beziehung zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Moleküls und seiner Struktur handelt. Insbesondere im Bereich der Wirkstoffentwicklung in der pharmazeutischen Industrie finden diese Prinzipien eine breite Anwendung. Strukturaktivitätsbeziehungen werden in der Wirkstoffforschung u. a. zur Evaluierung von Nebenwirkungen und zum Auffinden von Wirkstrukturen schon seit langem und in immer größerem Umfang angewandt - in neuerer Zeit auch in Kombination mit anderen experimentellen und Computerbasierten Methoden (Hillisch und Hilgenfeld 2003, Ekins 2007). Mit der neuen europäischen Chemikaliengesetzgebung (REACH) ist zu erwarten, dass sie auch zunehmend für Chemikalienbewertung angewendet werden. Erste Arbeiten in diesem Gebiet sind vermutlich bereits im Jahre 1842 entstanden: Eine lineare Beziehung zwischen den Siedepunkten von Alkanen mit der Kettenlänge wurde hergestellt (Temperaturzunahme von 18° C pro hinzukommender Methylengruppe, Abbildung 4-1).

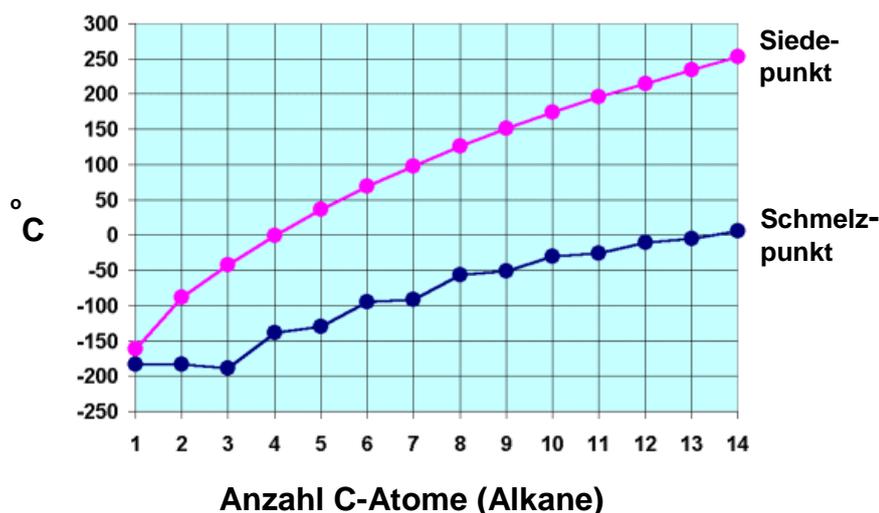


Abbildung 4-1: (Nichtlineare) Zunahme des Schmelz- und Siedepunkts bei linearen Alkanen mit der Kettenlänge

Dieses einfache Beispiel zeigt aber gleichzeitig auch schon die grundsätzliche Schwierigkeit, an der sich entsprechende Ansätze bewähren müssen: Die Eigenschaften verändern sich nicht linear mit der Struktur eines Moleküls. Veränderungen der Molekülstruktur beeinflussen physikalisch-chemische Eigenschaften von Stoffen, ihre Wirksamkeit, aber auch ihre Stabilität. Im Falle der Antibiotika aus der Gruppe der Fluorchinolone führte z. B. die Einführung eines Fluoratoms am aromatischen Kern einerseits zur verbesserten Wirksamkeit, andererseits aber auch zu einer er-

<sup>8</sup> Eigentlich Structure-Activity-Relationship (SAR), in der Literatur und im Folgenden jedoch oft im Sinne aller stofflichen Eigenschaften im qualitativen und quantitativem Sinne verstanden (Boethling und Mackay 2000).

höhten Lichtempfindlichkeit der Patienten und einer schlechten biologischen Abbaubarkeit (Abbildung 4-2).

Die Hersteller neuer Wirkstoffe nutzen Strukturwirkungsbeziehungen bei der Neuentwicklung von Wirkstoffen insbesondere, um Kandidaten mit unerwünschten Nebenwirkungen möglichst früh aussondern zu können (Hillisch und Hilgenfeld 2003, Cronin 2003, Ekins 2007), was neben einer Kosten- und Zeitersparnis auch ermöglicht, Tierversuche zu ersetzen (z.B. EC VAM 1 997, <http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm>).

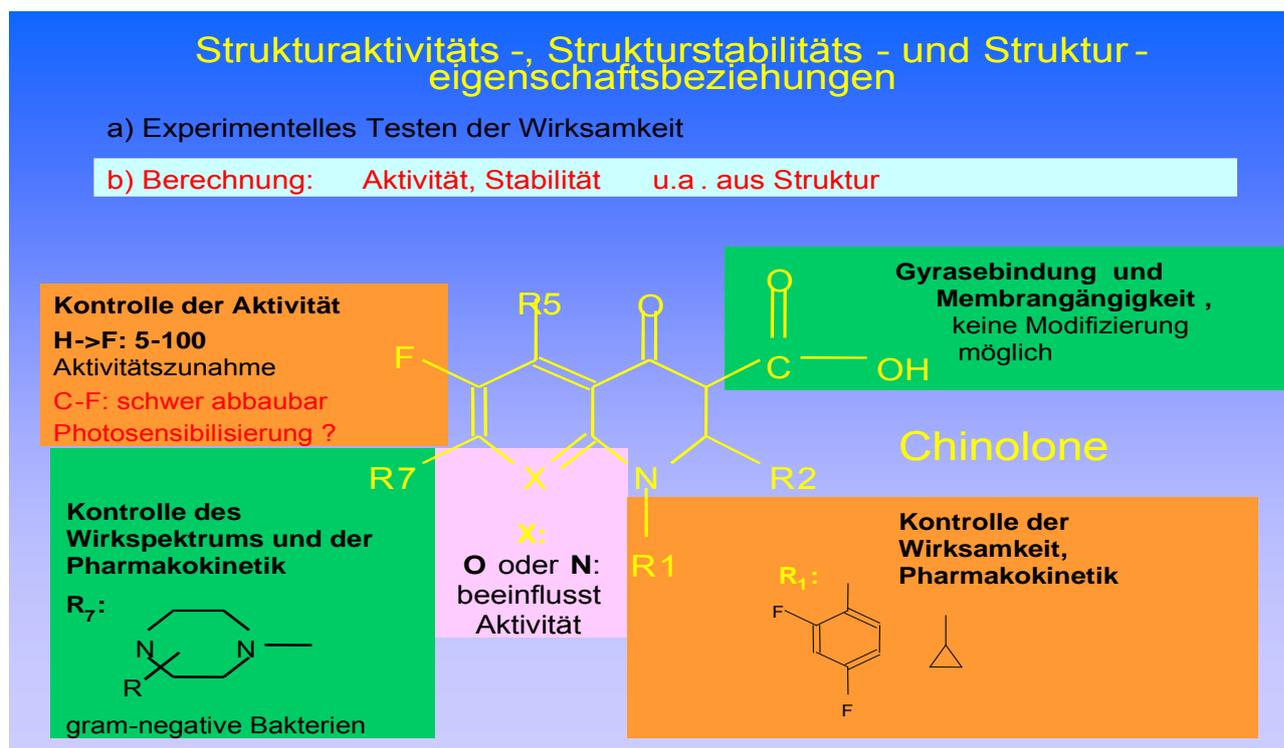


Abbildung 4-2: Chemische Strukturelemente und ihre Bedeutung für die Eigenschaften am Beispiel eines antibiotischen Wirkstoffs der Gruppe der Fluorchinolone.

Für die Beurteilung der physikalisch-chemischen Eigenschaften wie z.B. der Wasserlöslichkeit und des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log P_{OW}$ ), der Aktivität und der Toxizität bzgl. „klassischer“ Wirkungen wie Mutagenität und Karzinogenität stehen leistungsfähige kommerzielle Computerprogramme zur Verfügung (z. B. Multicase, Leadscope, TOPKAT, BESS, OREX; DEREK, ChemProp, und andere, s. z.B. Ekin 2007). Die SAR-Methodik darf aber dennoch nicht als ganz exaktes Vorhersageinstrument betrachtet werden. Dies ist insbesondere dann wichtig zu beachten, wenn die Software bzw. die zugehörigen Modelle retrospektiv zur Stoffbewertung im legislativen Sinn verwendet werden sollen. Ansonsten können sie als Screeninginstrumente (s.o. Anwendung in der Wirkstoffentwicklung) wertvolle Dienste leisten. Auch als Explorationstools können sie hilfreich sein: Liefern sie völlig unerwartete Ergebnisse, obwohl das Modell gut validiert ist und bei anderen Molekülen

den Kenntnissen über den Wirkmechanismus für den jeweils betrachteten Endpunkt entspricht, so ist dies ein Hinweis darauf, dass in diesem Fall ein anderer Mechanismus vorliegen könnte. Gute Software ist zudem in der Lage unspezifische Toxizität („Baseline-Toxicity“ z.B. aufgrund unspezifischer Wechselwirkung eines Stoffes mit der Zellmembran) zu erkennen und zu berücksichtigen.

Die derzeit verfügbaren Computermodelle und Softwarepakete weisen z. T. individuelle Schwächen auf, die aber durch eine geschickte Kombination verschiedener Ansätze insgesamt zumindest verringert werden können und zu weiteren Erkenntnissen führen. D. h. auch dann, wenn für bereits bekannte Moleküle und ihre Eigenschaften eine nicht ganz richtige Vorhersage getroffen wird oder für neue Moleküle eine gänzlich unerwartete erhalten wird, ist dieses Ergebnis von Bedeutung. Es ist ein Hinweis darauf, dass genauere Betrachtungen, z. B. zu Mechanismen, notwendig sind. Und natürlich muss auch die Datenqualität im Modell hinterfragt und ggf. ergänzt werden. In diesem Sinne sind die Modelle als Expertensysteme zu verstehen. Sie bedürfen stets der Ergänzung durch spezifische Expertise sowie zumindest zu Beginn einer experimentellen Verifizierung an ausgewählten Beispielen, nicht zuletzt, um die Datenbasis und damit die Güte und Reichweite der Vorhersage einschätzen und laufend verbessern zu können. Daraus folgt auch, dass für Endpunkte, für die bisher keine bzw. nicht genügend experimentelle Daten ausreichender Qualität aus standardisierten Tests zur Verfügung stehen, auch keine QSAR-Modelle entwickelt werden können und der Stoffbewertung zur Verfügung stehen.

#### **4.2.3 Für die zu untersuchenden Endpunkte näher betrachtete Software und Modelle**

In den letzten 20 Jahren wurden ganz allgemein eine Vielzahl spezifischer QSAR-Modelle zu den unterschiedlichsten Endpunkten erstellt und in der Literatur veröffentlicht (Übersicht s. Ekins 2007). Deren Wert ist jedoch für die hier vorliegende Fragestellung nur gering. Einerseits umfassen sie meist eine sehr kleine Anwendungsdomäne und die älteren von ihnen dürften andererseits aufgrund des Alters der Untersuchungen und der damit oft einhergehenden geringen Datenqualität nicht mehr als valide anzusehen sein. Für neue wie die hier zu untersuchenden Endpunkte ist die Anzahl zur Verfügung stehender Modell naturgemäß geringer. Auch am Markt ist eine Vielzahl von Anwendungen (Software, Modelle) für QSAR-Berechnungen von kommerziellen Anbietern (s. z.B. Kapitel 4.2.1, 4.2.4). Diese kostenpflichtige Software wird vor allem für die pharmazeutische Industrie für Endpunkte angeboten und entwickelt, die bei Werkstoffentwicklung sowohl für die Wirkungsoptimierung als auch zum Screening (z.B. Toxizität) neben anderen computerbasierten Ansätzen Verwendung finden (Hillisch und Hilgenfeld 2003, Ekins 2007). Da für die regulatorische Toxikologie in der Vergangenheit QSAR nicht oder kaum verwendet wurden, wurden für diesen Anwendungsbereich bisher auch kaum Modelle entwickelt. Neuerdings hat sich mit der Einführung von REACH die Situation jedoch verändert und es finden sich eine Vielzahl Internetbasierter Anwendungen, die für Einzelabfragen (also nicht im Batch-Mode) zum Teil sogar kostenlos genutzt werden können (s. Kapitel 4.2.4). Die verfügbaren Endpunkte sind jedoch bei den öffentlich verfügbaren Anwendungen generell mehr eingeschränkt als bei den kommerziellen. Zunehmend werden auch von offiziellen Stellen im Rahmen von REACH und den USA Internetbasierte QSAR-Modelle zugänglich gemacht, so z.B. Toxtree vom European Chemicals Bureau und Toxcast/Actor von der U.S. Amerikanischen Umweltbehörde oder der OECD (OECD

Toolbox). Da diese offiziellen und gesetzlich relevanten Zwecken dienen, ist von einer guten Validierung und entsprechenden Qualität der Vorhersagen auszugehen. Diese Ansätze werden daher im Folgenden weiter betrachtet. Generell ist es aber für den Anwender oft unklar, von welcher Qualität die Prädikationen sind und ob die abgefragten Moleküle in der Anwendungsdomäne des entsprechenden Modells liegen. Diese Information erhalten zu können, ist jedoch für alle Modelle und Software ein Qualitätsmerkmal, dessen Fehlen ihre Anwendung sehr einschränkt, da dann die Qualität der Modellierung/Prädikation vom Anwender nicht eingeschätzt werden kann (Eriksson et al. 2003, Walker et al. 2003). Daher wurden im Weiteren solche Modelle nicht weiter betrachtet. Vielmehr liegt der Fokus auf den bei größeren Anbietern verfügbaren Software, die allgemein Verwendung findet und deren Datenbasis und Validierung möglichst transparent sind, sowie der von offiziellen Stellen zugänglich gemachten Software.

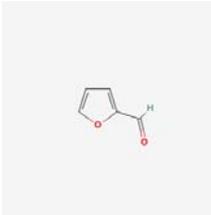
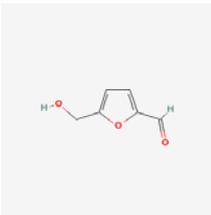
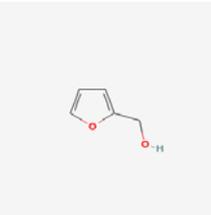
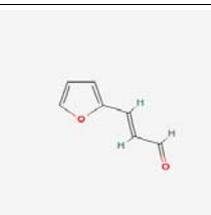
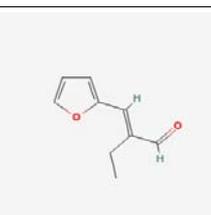
#### **4.2.4 Rechercheergebnisse und Berechnungen**

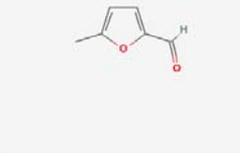
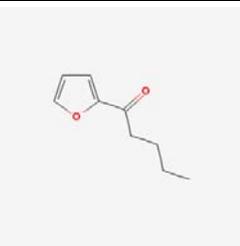
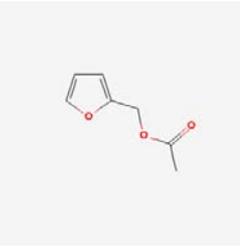
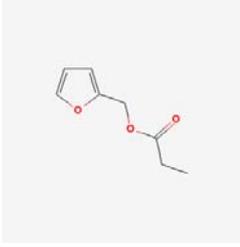
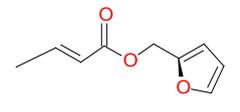
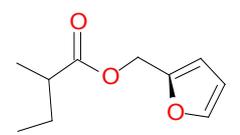
Es wurde bei verschiedenen wichtigen Anbietern (s. Kapitel 4.2.4.1, 4.2.4.2) kommerzieller Systeme abgefragt, ob für die oben genannten Endpunkte die ausgewählten Moleküle in der Anwendungsdomäne der jeweiligen Modelle liegen. Ebenso wurden die von offiziellen Stellen zur Verfügung gestellten Softwarepakete daraufhin untersucht.

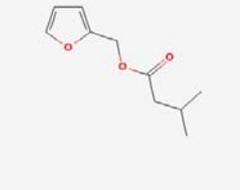
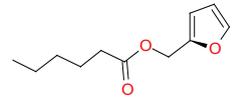
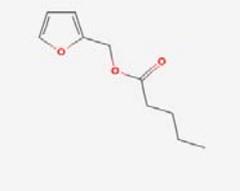
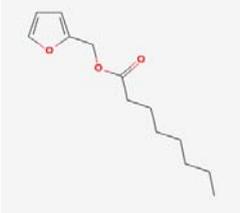
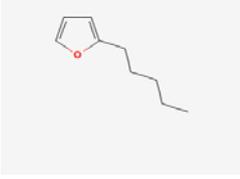
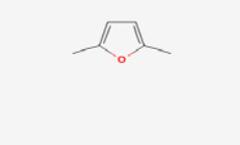
##### **4.2.4.1 Neurodegeneration oder Neurotoxizität**

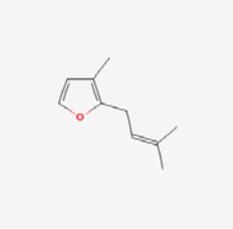
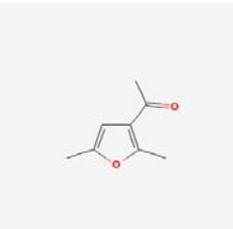
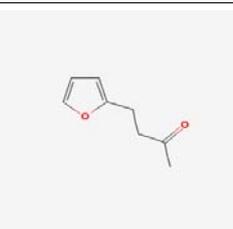
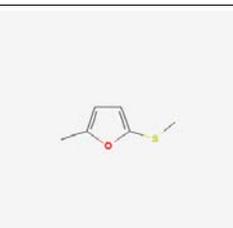
In einer umfangreichen Recherche (Internet, z.T. persönlicher Kontakt zu den Softwareanbietern etc.) wurde festgestellt, dass es zur Neurodegeneration keine QSAR-Modelle gibt. Eine analoge Recherche zum Endpunkt Neurotoxizität ergab, dass es einzelne Modelle bei Softwareanbietern gibt. Es ist jedoch nicht zuletzt aufgrund der schmalen experimentellen verfügbaren Datenbasis davon auszugehen, dass entsprechende Modelle (Module) zur Neurotoxizität bei einzelnen Anbietern i.a. eine eher eingeschränkte Anwendungsdomäne aufweisen werden. Die betrachteten Moleküle sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Smiles-Codes für ausgewählte Moleküle der Endpunkte Neurodegeneration/ Neurotoxizität mit berechneten log P<sub>OW</sub>-Werten und Angabe, ob die Lipinski Rule of Five erfüllt ist (\*:Multicase gibt an, dass eine Prädikation Einschränkungen unterliegt, z.B. weil im Modell bestimmte Strukturelemente nicht vorhanden sind, s. Text).

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>OW</sub> (berechnete Werte)	Prädikation mit Multi-case (Modul A33)	Lipinski Rule of Five
1	Furfural 98-01-1		<chem>C1=COC(=C1)C=O</chem>	0,4	*	+
2	5-Hydroxymethyl-furfuraldehyd 67-47-0		<chem>C1=C(OC(=C1)C=O)CO</chem>	-0,6	*	+
3	Furfurylalkohol 98-00-0		<chem>C1=COC(=C1)CO</chem>	0,3	-	+
4	cis-β-(2-Furyl)-acrolein 623-30-3		<chem>O1C=CC=C1C=CC=O</chem>	1,1	*	+
5	2-Ethyl-3-(2-furyl)acrolein 770-27-4		<chem>CCC(=CC1=C(C=CO1)C=O</chem>	2	*	+

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>OW</sub> (berechnete Werte)	Prädikation mit Multi-case (Modul A33)	Lipinski Rule of Five
6	5-Methylfurfuraldehyd 620-02-0		<chem>CC1=CC=C(O1)C=O</chem>	0,7	*	+
7	2-Pentanoylfuran 3194-17-0		<chem>CCCCC(=O)C1=CC=CO1</chem>	1,9		+
8	Furfurylacetat 623-17-6		<chem>CC(=O)OCC1=CC=CO1</chem>	0,7		+
9	Furfurylpropionat 623-19-8		<chem>CCC(=O)OCC1=CC=CO1</chem>	1,2		+
10	Furfuryl-but-2-enoat 59020-84-7		<chem>C/C=C/C(=O)OCc1ccco1</chem>	1,8		+
11	Furfuryl-2-methylbutyrate 13678-61-0		<chem>CCC(C)C(=O)OCc1ccco1</chem>	2,3		+

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>OW</sub> (berechnete Werte)	Prädikation mit Multi-case (Modul A33)	Lipinski Rule of Five
12	Furfurylisovalerat 13678-60-9		<chem>CC(C)CC(=O)OCc1ccoc1</chem>	2		+
13	Furfurylhexanoat 39252-02-3		<chem>CCCCCC(=O)OCc1ccoc1</chem>	2,8		+
14	Furfurylvalerat 36701-01-6		<chem>CCCCC(=O)OCc1ccoc1</chem>	2,1		+
15	Furfuryloctanoat 39252-03-4		<chem>CCCCCCCC(=O)OCc1ccoc1</chem>	3,7		+
16	2-Pentylfuran 3777-69-3		<chem>CCCCC1=CC=CO1</chem>	3,7		+
17	2,5-Dimethylfuran 625-86-5		<chem>CC1=CC=C(O1)C</chem>	2,2		+

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>OW</sub> (berechnete Werte)	Prädikation mit Multicase (Modul A33)	Lipinski Rule of Five
18	2-(3-Methyl-2-butenyl)-3-methylfuran 15186-51-3		<chem>CC1=C(OC=C1)CC=C(C)C</chem>	3,3		+
19	2,5-Dimethyl-3-acetylfuran-3-yl)ethanon 10599-70-9		<chem>CC1=CC(=C(O1)C)C(=O)C</chem>	1,5		+
20	Furfurylaceton 699-17-2		<chem>CC(=O)CCC1=CC=CO1</chem>	0,8		+
21	5-Methylfuryl sulfid 13678-59-6		<chem>CC1=CC=C(O1)SC</chem>	2,7	*	+

#### 4.2.4.1.1 Multicase

Multicase (<http://www.multicase.com>) ist ein selbst lernendes System, das quantenchemische Berechnungen und die An- bzw. Abwesenheit von Strukturelementen sowie genetische Algorithmen für die Prädikation nutzt. Multicase bietet mehrere Modelle zur Neurotoxizität an (<http://www.multicase.com/products/prod097.htm#Ter5>), alle mit demselben Endpunkt aber unterschiedlichen Datensätzen (z.B. unterschieden nach Ratte und Maus): FDA Behavioural Toxicity, Rodents, full set, FDA Behavioural Toxicity, Rodents part (vier verschiedene Module mit unterschiedlicher Anzahl von Stoffen). Laut Auskunft von Multicase befinden sich weitere Module zur Prädikation von Neurotoxizität und zur Überwindung der Blut-Hirnschranke zusammen mit der FDA in Entwicklung. Ab wann sie zur Verfügung stehen werden, kann derzeit nicht genau gesagt werden. Es wurde für die Prädikation im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung das Modul (A Q 1) FDA Behavioural Toxicity, Rodents,

full set ausgewählt, da es die meisten Datensätze enthält (670), um zu prüfen, ob die hier interessierenden Stoffe enthalten sind. Die Ergebnisse sind Tabelle 4-1 zu entnehmen: Die Moleküle 1, 2, 4, 5, 6 und 21 wurden mit Warnungen („warnings“; \*) versehen, d.h. eine Prädikation unterliegt Einschränkungen, z.B. weil im Modell bestimmte Strukturelemente nicht vorhanden sind, „-“ bedeutet, dass eine Prädikation uneingeschränkt möglich ist. Eine Prädikation wurde nicht durchgeführt. Molekül Nr. 21 ist ein Sulfid, die anderen sind Aldehyde.

#### 4.2.4.1.2 Leadscope

Leadscope (<http://www.leadscope.com/>) bietet verschiedene Datenbanken mit den entsprechenden Datensätzen an. Laut Leadscope sind in den verschiedenen Datenbanken auch einige wenige mit Neurotoxizität in Zusammenhang stehende Endpunkte enthalten. Die Suche nach Studien mit histopathologischen Daten/Ergebnissen, die Wirkungen auf das Gehirn zeigten, ergab unter „Functional Toxicity – Organ Weight Brain“ Styrol als einzigen Treffer ( $\log P_{OW}$  2,33). Dementsprechend konnten für die hier betrachteten Verbindungen keine Daten gefunden werden, was darauf hinweist, dass die Datenlage für die hier betrachteten chemischen Verbindungen und Endpunkte generell schlecht ist. Leadscope bietet auch ein von der U.S. Amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) benutztes QSAR-Modell für Neurotoxizität an (Verhalten von Jungtieren), das sich in drei Untermodule gliedert: Maus, Ratte, Nager. Eine exemplarische Prädikation für Furfural mit diesem Modell ergab für Maus: Außerhalb der Anwendungsdomäne, für Ratte und Nagetiere insgesamt negativ. Ein Blick in die Liste der strukturellen Elemente, die maßgeblich zu diesem Modell beitragen, zeigt, dass Furane, nicht von großer Bedeutung sind, eher Pyrane, was die erhaltene Prädikation bestätigt. Auch die Lipinski Rule of Five ist nicht als markanter Parameter eingestuft. Hingegen spielt der  $\log P_{OW}$  – wie zu erwarten – eine Rolle.

#### 4.2.4.1.3 Lhasa-DEREK

Lhasa (<http://www.lhasalimited.org/>) bietet im Rahmen des Systems DEREK ([http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub\\_cat=64](http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub_cat=64)), das im Gegensatz zu Leadscope und Multicase ein regelbasiertes System ist, Prädikation für Neurotoxizität an. Eine Abfrage über Dritte<sup>9</sup> ergab folgendes: Acrylamid wird als Neurotoxin angezeigt ("mammals, probable"). Ein Mechanismus-Vorschlag beruht auf dem Zwischenprodukt Glycidamid. Für Propenal und Furfural ergab sich hingegen eine negative Vorhersage. Die anderen Verbindungen sind Abkömmlinge vom Furfural. Daher gibt es von DEREK als regelbasiertem System die gleiche Aussage wie für Furfural.

Neurodegeneration wird nicht vorhergesagt; dieser Endpunkt ist offenbar noch nicht als separater Endpunkt vorhanden. Bezüglich Alzheimer-ähnlichen Effekten, die in der neueren Forschung mit Alkenalen beschrieben wurden, ergab die Rücksprache mit einem erfahrenen Toxikologen aus der Industrie, der mit DEREK vertraut ist, dass dieser Mechanismus wahrscheinlich zu wenig gesichert ist, um schon im Bereich QSAR und der regelbasierten Vorhersagewerkzeuge aufgenommen werden könnte.

---

<sup>9</sup> Eine direkte Anfrage bei Lhasa wurde bisher nicht beantwortet.

Es konnte nicht geklärt werden, ob dieser Endpunkt in absehbarer Zeit aufgenommen werden soll.

#### 4.2.4.1.4 Accelrys

Accelrys (<http://accelrys.com/>) bietet im Rahmen des Softwarepakets TopKat kein Modell für Neurotoxizität an. Topkat Ab der Version 6.2 verwendet TopKat elektrotopologische, Form- und Symmetriedescriptoren.

#### 4.2.4.1.5 Toxtree

In dem vom European Chemicals Bureau angebotenen System Toxtree (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/index.php?c=TOXTREE>) (s. dazu auch AMBIT: <http://ambit.sourceforge.net/intro.html>) sind strukturelle Alerts für die Identifizierung von sogenannten Michael-Akzeptoren enthalten. Michael-Akzeptoren sind  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte organische Verbindungen wie z.B. Propenal oder Acrylamid, die in der sogenannten Michael-Reaktion mit anderen Molekülen in einer 1-4-Additionsreaktion reagieren. Von den ausgewählten Molekülen wird lediglich Propenal als positiv angezeigt. Dies steht im Widerspruch zu den mit DEREK erhaltenen Ergebnissen. Zwar sind die Verbindungen formal Michael-Akzeptoren, bzgl. der Reaktivität jedoch als Michael-Akzeptoren weniger reaktiv, da die  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte C-C-Bindung Teil des aromatischen Furanrings ist. Da dessen Aromatizität bei einer Reaktion gestört würde, was energieaufwändig ist, liegt eine deutlich verminderte Reaktivität vor. Unklar ist, ob diese rein chemische Interpretation auch unter Bedingungen der enzymatischen Katalyse in Organismen zutreffend ist.

#### 4.2.4.1.6 OECD Toolbox

In der OECD-Toolbox ([http://www.oecd.org/document/54/0,3343,en\\_2649\\_34379\\_42923638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/54/0,3343,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html)) findet sich der Profiling Punkt "Michael-Addition N/A Potency example based on GSH reactivity", der vom Laboratory of Mathematical Chemistry an der Universität Bourgas (Bulgarien) erarbeitet wurde (<http://www.oasis-lmc.org/>). Eine exemplarische Abfrage ergab negative Klassifizierung für Furfural und 5-Hydroxymethylfurfuraldehyd. Ein QSAR-Modell konnte nicht erstellt werden, da eine Analyse der zur Verfügung stehenden Moleküle ergab, dass keine Furane und nur zwei aromatische Aldehyde in den Datenbanken vorhanden sind, so dass die Anwendungsdomäne eines solchen Modells keine Furanderivate enthalten würde und somit jegliche Prädikation wertlos wäre.

#### 4.2.4.1.7 Toxcast/Actor

Die Datenbank Toxcast und das Abfragemodul Actor der U.S. amerikanischen Umweltbehörde (<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>) liefern Daten, wenn es valide Daten oder Berichte über einen spezifischen Endpunkt einer Substanz gibt. Es handelt sich daher nicht um eine Computerbasierte Prädikation toxischer Eigenschaften, sondern um ein Rechercheinstrument. Für Propenal wird ein Bericht zur experimentell festgestellten Neurotoxizität angezeigt. Für die anderen Verbindungen nicht. Diese geringe Ausbeute ist ein weiterer Indikator dafür, dass u.a. deshalb keine Modelle verfügbar sind, weil nicht genügend experimentelle Daten in der notwendigen Qualität zur Verfügung stehen.

#### 4.2.4.1.8 HazardExpert

HazardExpert (<http://www.compudrug.com/>) ist ebenfalls ein Softwaresystem zur Prädikation verschiedener Toxizitäten und der Bioverfügbarkeit von chemischen Stoffen. Es handelt sich wie bei DEREK um ein regelbasiertes System, das u.a. auf linearen freien Energiebeziehungen beruht (Ekins 2007). Wie alle regelbasierten Systeme beruht es auf der Identifizierung von relevanten chemischen Teilstrukturen. HazardExpert bietet ein Modul zur Neurotoxizität an. Weitergehende Informationen waren nicht verfügbar.

#### 4.2.4.1.9 Schlussfolgerung

Im Überblick ergibt sich zu der nur mit deutlichen Einschränkungen interpretierbaren Auswertung

- Die auf Basis experimenteller Befunde eindeutig als neurotoxisch anzusehenden Substanzen Acrylamid und Propenal erbrachten widersprüchliche Ergebnisse in den vorliegenden Prädikationen (vgl. Gegenüberstellung DEREK vs. TOXTREE bzw. TOXCAST).
- Die positiven Hinweise auf eine Neurotoxizität von Furfural und Abkömmlingen bzw. Furanen (vgl. Abschnitt 2.1) konnten mit QSAR nicht bestätigt werden.

Tabelle 4-2: Übersicht der Prädikationen diverser QSAR-Modelle zur Neurotoxizität ausgewählter Substanzen (vgl. Abschnitt 2.1)

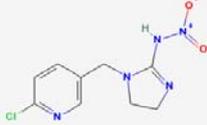
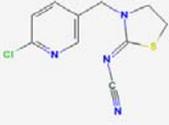
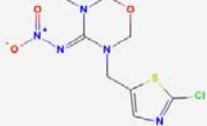
QSAR-Modell	Prädikation positiv (Hinweis auf Neurotoxizität)	Prädikation negativ (Hinweis, spricht gegen Neurotoxizität)	Bemerkung
Multicase			Prädikation nicht für alle Moleküle sicher, da strukturelle Elemente fehlen („warnings“)
Leadscope		Furfural negativ in Untermodul; keine Aussage im Standardprogramm	Datengrundlage unzureichend (nur wenige Furane berücksichtigt)
Lhasa-DEREK	Acrylamid	Propenal, Furfural, Furfuralabkömmlinge negativ	
Accelrys			Keine Aussagen zur Neurotoxizität
Toxtree	Propenal	Acrylamid, Furfural und Abkömmlinge	
OECD toolbox		Furfural und 5-Hydroxymethylfuralaldehyd	Keine Aussage zu Furanderivaten und Aldehyden
Toxcast/Actor	Propenal		
HazardExpert			Keine Aussage möglich

Damit ließen sich die Verdachtsmomente aus der Struktur und dem vermuteten Mechanismus sowie aus wenigen experimentellen Studien (überwiegend *in vitro*) auf eine Neurodegeneration oder sonstige Neurotoxizität für diese Stoffe nicht bestätigen (vgl. auch Diskussion in Abschnitt 4.4 dieses Gutachtens), wobei dies aufgrund der sehr beschränkten Aussagefähigkeit der QSAR-Modelle für diese Substanzen und diesen Endpunkt die Hypothese einer solchen neurotoxischen Wirkung nicht abschließend entkräftet. Alle Substanzen sind nach den hier angestellten Vorhersagen hinreichend bioverfügbar (Lipinski Rule of Five; vgl. Abschnitt 4.2.4.3.2) und könnten insofern prinzipiell biologische Aktivität entfalten.

#### 4.2.4.2 Verzögerte allergische Reaktion/Immuntoxizität

Die für den Endpunkt Verzögerte allergische Reaktion/Immuntoxizität betrachteten Moleküle sind in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Smiles-Codes für ausgewählte Moleküle der Endpunkte verzögerte allergische Reaktion/Immuntoxizität mit berechneten log P<sub>OW</sub>-Werten und Angabe, ob die Lipinski Rule of Five erfüllt ist (\*:Multicase gibt an, dass eine Prädikation Einschränkungen unterliegt, z.B. weil im Modell bestimmte Strukturelemente nicht vorhanden sind, s. Abschnitt 4.2.4.1, Tabelle 4-1).

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>OW</sub> (berechnete Werte)	Lipinski Rule of Five
1	<b>Imidacloprid</b> 105827-78-9 138261-41-3		<chem>C1CN(C(=N1)N[N+](=O)[O-])CC2=CN=C(C=C2)Cl</chem>	0,8	+
2	<b>Thiacloprid</b> 111988-49-9		<chem>C1CSC(=NC#N)N1CC2=C(N=C(C=C2)C</chem>	2,2	+
3	<b>Thiamethoxam</b>  153719-23-4		<chem>CN1COCN(C1=N[N+](=O)[O-])CC2=CN=C(S2)Cl</chem>	1,95	+

Lfd. Nummer	Name/CAS Nr.	Struktur	Smiles	log P <sub>ow</sub> (berechnete Werte)	Lipinski Rule of Five
4	<b>Clothianidin</b> 205510-53-8		<chem>CN=C(NCC1=CN=C(S1)Cl)N[N+](=O)[O-]</chem>	1,2	+

Eine umfangreiche Recherche ergab, dass es keine kommerziellen, allgemein anwendbaren QSAR Modelle zu verzögerter allergischer Reaktion, lediglich vereinzelt zu Immuntoxizität als Endpunkt gibt. Fast alle kommerziellen Hersteller bieten Daten und/ oder Modelle zur Prädikation von Hautreizung an, allerdings nicht für die hier im Zentrum des Interesses stehenden Endpunkte.

In einem EU-Projekt, das zwischen 2001 und 2003 durchgeführt wurde, ([http://cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=proj.document&CFTOKEN=51089429&PJ\\_RCN=4862692&CFID=8981167](http://cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=proj.document&CFTOKEN=51089429&PJ_RCN=4862692&CFID=8981167)), wurden für zwei bekannte und weit verbreitete Gruppen von Allergenen (aliphatische Aldehyde und  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Aldehyde (Grundstruktur: Propenal) QSAR entwickelt. Auf der EU-Cordis-Internetseite sind die aus diesen QSAR abgeleiteten Kenntnisse verfügbar, um sie in Expertensysteme zur Toxizitätsvorhersage inkorporieren zu können. Es sind aber keine Modelle zur Prädikation verfügbar. Die QSAR-Modelle selbst sind demnach bisher nicht verfügbar. Insbesondere aus dem Bereich der Kosmetika wurden Mitte der 90er Jahre einige spezifische QSAR-Modelle erstellt, deren Wert jedoch aufgrund der Tatsache, dass sie einerseits i.A. nur eine sehr kleine Anwendungsdomäne haben dürften (Inhaltsstoffe von Kosmetika) und andererseits aufgrund des Alters der Untersuchungen nicht mehr als valide anzusehen sind bzw. nicht den für die hier zu betrachteten Moleküle passenden Anwendungsbereich haben, als gering einzuschätzen ist.

#### 4.2.4.2.1 Multicase

Multicase (<http://www.multicase.com>) bietet mehrere Modelle zu allergischen Reaktionen, eines zu allergischer Kontaktdermatitis mit 1003 Substanzen in der Datenbasis. Sofern also dieser Endpunkt betrachtet werden sollte, könnten er folversprechende Prädikationen durchgeführt werden.

Zur Immuntoxizität befinden sich nach Angaben von Multicase Modelle zusammen mit der FDA in Entwicklung, ebenso für den Endpunkt (verzögerte) allergische Reaktionen. Es ist derzeit nicht abzuschätzen, bis wann entsprechende Modelle zur Prädikation verfügbar sein werden.

#### 4.2.4.2.2 Leadscope

Leadscope bietet zu Immuntoxizität/verzögerte allergische Reaktion keine Modelle an. Für die hier betrachteten Verbindungen konnten auch keine Daten in den von Leadscope angebotenen Datenbanken gefunden werden, was darauf hinweist, dass

die Datenlage für die hier betrachteten chemischen Verbindungen generell schlecht ist. Wie die meisten der anderen Anbieter sind Daten und damit Modelle für Hautreizung verfügbar.

#### 4.2.4.2.3 Lhasa - DEREK

Lhasa (<http://www.lhasalimited.org/>) bietet im Rahmen des Systems DEREK ([http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub\\_cat=64](http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub_cat=64)), das im Gegensatz zu Leadscope und Multicase ein regelbasiertes System ist, ein allgemeines Modul zur Immuntoxizität an, das aber nicht spezifisch für einen Wirkmechanismus ist.

#### 4.2.4.2.4 Accelrys

Accelrys (<http://accelrys.com/>) bietet im Rahmen des Softwarepakets TopKat „Skin Sensitization“ (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/toxicology/>) als Parameter an. Weitere Informationen hierzu fehlen.

#### 4.2.4.2.5 Toxtree

In Toxtree (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/gsar/>) ist, wie bei fast allen anderen hier beschriebenen Anwendungen, ein Modul für Skin-Irritation verfügbar, keines für Immuntoxizität oder spezifisch für verzögerte allergische Reaktion.

#### 4.2.4.2.6 OECD Toolbox

In der OECD-Toolbox ([http://www.oecd.org/document/23/0,3343,en\\_2649\\_34379\\_33957015\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/23/0,3343,en_2649_34379_33957015_1_1_1_1,00.html)) findet sich der Punkt "Immuntoxizität". Ein QSAR-Modell konnte nicht erstellt werden, da die Anwendungsdomäne eines solchen Modells für die hier betrachteten Moleküle nicht eruiert werden konnte, so dass jegliche Prädikation fragwürdig wäre. Es handelt sich bei den in der Datenbank hinterlegten Molekülen um die üblichen Industriechemikalien.

#### 4.2.4.2.7 Toxcast/Actor

Die Datenbank Toxcast und das Abfragemodul Actor (<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>) liefern einen Hinweis, wenn es valide Daten/Berichte über einen spezifischen Endpunkt einer Substanz gibt. Es handelt sich also nicht um ein QSAR-basiertes Prädikationssystem. Es wurden keine entsprechenden Ergebnisse gefunden.

#### 4.2.4.2.8 HazardExpert

In HazardExpert ist kein Modell zur Prädikation von (verzögerter) allergischer Reaktion oder Immuntoxizität verfügbar.

### 4.2.4.3 Sonstige Parameter

#### 4.2.4.3.1 Passage der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke muss von Molekülen, die als Neurotoxine im Gehirn wirken sollen, überwunden werden. Daher kann die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

zunächst als Surrogatparameter dienen. Bei keiner der recherchierten Ansätze sind dazu aber Module verfügbar. Unter <http://cheminformatics.org/> findet sich eine Datenbank mit 415 chemischen Strukturen, die für ja/nein-Modelle geeignet zu sein scheinen. Laut Angaben von Multicase befinden sich Modelle zusammen mit der FDA in Entwicklung.

#### 4.2.4.3.2 Lipinski Rule of Five

Ein weiterer, orientierender „Filter“, die Erfüllung der Lipinski Rule of Five (Lipinski et al. 1997 und 2001, Ghose et al. 1999) bieten verschiedene Hersteller an (z.B. Multicase). Nach der Lipinski Rule of Five hat eine chemische Substanz eine gute orale Bioverfügbarkeit, wenn sie folgende Bedingungen erfüllt:

- Nicht mehr als fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z. B. OH- oder NH-Gruppen)
- Nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (z. B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome)
- Eine Molekülmasse von nicht mehr als 500 g/mol
- Einen Verteilungskoeffizienten ( $\log P_{OW}$ ) zwischen Oktanol und Wasser (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) von maximal 5

Zur besseren Beurteilung der „Druglikeness“ (1997 von Lipinski et al. erstmalig veröffentlicht) wurden die ursprünglichen Regeln erweitert und 1999 von Ghose et al. publiziert:

- Der Verteilungskoeffizienten ( $\log P_{OW}$ ) liegt in einem Bereich zwischen -0.4 und +5.6
- Die molekulare Brechung liegt zwischen 40 und 130
- Die molare Masse liegt zwischen 160 und 480
- Die Anzahl der Schweratome liegt zwischen 20 und 70

Alle Moleküle in Tabelle 4-1 erfüllen die Lipinski Rule of Five (ursprüngliche Kriterien von Lipinski et al. gemäß obiger Aufstellung), d.h. unter diesem Aspekt könnten die in Tabelle 4-1 aufgeführten Moleküle die vermutete Wirkung entfalten.

### 4.3 Bewertung biochemischer Parameter als Ähnlichkeitskriterien bei QSAR

#### 4.3.1 Chemieinformatik

Chemoinformatik, Cheminformatics oder Chemieinformatik (engl. chemoinformatics, cheminformatics, chemical informatics) bezeichnet einen Wissenschaftszweig, der das Gebiet der Chemie mit Methoden der Informatik verbindet mit dem Ziel, Methoden zur Berechnung von Moleküleigenschaften zu entwickeln und anzuwenden. Der Begriff „Chemoinformatik“ ist relativ jung, während die älteren Termini Computerchemie (abgeleitet von engl. Computational Chemistry) und chemische Graphentheorie das gleiche Gebiet bezeichnen. Computerchemie wird heute zutage

eher als ein Teilgebiet der Theoretischen Chemie und der Quantenchemie begriffen. Durch Induktion können neue Hypothesen über molekulare Eigenschaften, wie z. B. die Löslichkeit, die Toxizität oder die Abbaubarkeit entwickelt werden.

#### 4.3.2 Repräsentation chemischer Moleküle in der Chemieinformatik und QSAR

Die Repräsentation chemischer Strukturen ist eine der grundlegenden Fragestellungen der Chemieinformatik. Molekülstrukturen können als Graphen aufgefasst werden. Als ihre Repräsentation ist für viele Anwendungen bereits die sog. Bindungstabelle (engl. connection table) ausreichend, in der die Art der Verknüpfungen (Bindungen) zwischen den einzelnen Atomen eines Moleküls abgelegt ist. Erst für weitergehende Betrachtungen kann die Einbeziehung von zweidimensionalen (2D-) bzw. dreidimensionalen (3D-) Koordinaten notwendig werden. Die Größe des gesamten theoretischen chemischen Raumes, welcher aus allen denkbaren (virtuellen) Molekülstrukturen besteht, wird auf etwa  $10^{62}$  Moleküle geschätzt und ist damit weit größer als die Menge der bisher real synthetisierten Moleküle (Lahana 1999). Mit Hilfe von Computerbasierten Methoden („in silico“) lassen sich aber unter Umständen viele Millionen Moleküle bereits theoretisch analysieren, ohne diese zunächst für Messungen im Labor synthetisieren zu müssen. Darin liegen der Reiz und ein Vorteil für die Bewertung von chemischen Stoffen.

Voraussetzung für eine Modellierung und damit auch der Prädikation von Moleküleigenschaften ist eine Korrelation der Eigenschaft mit Strukturelementen. Grundlagen von Moleküleigenschaften sind neben direkt messbaren Größen wie z.B. Wasserlöslichkeit oft physikalisch-chemische Eigenschaften wie z.B. die Oberflächenpolarität, die nicht direkt zugänglich sind oder nur sehr aufwändig gemessen werden können. Solche Größen werden daher z.T. mit entsprechenden Softwarepaketen der theoretischen Chemie u.a. auf quantenchemischer Basis berechnet. Verfahren, die keine empirischen Parameter zur Berechnung von Molekülparametern benötigen, werden als **ab initio** - Methoden bezeichnet. Semiempirische Verfahren enthalten empirische Größen und weitere semiempirische Parameter, die durch theoretische Vorgehensweisen bestimmt wurden, jedoch keinen Bezug zu messbaren Größen mehr haben.

Es gibt verschiedene wichtige Themen innerhalb des Gebietes. Für die vorliegende Fragestellung sind quantitative Struktur-Eigenschafts-/Wirkungs-Beziehungen (QSPR/QSAR) von Interesse: Mit Hilfe geeigneter Algorithmen werden Kodierungen für Moleküle entwickelt. Man unterscheidet grundsätzlich zwei unterschiedliche Herangehensweisen, zum einen sogenannte

regelbasierte Systeme (wie z.B. DEREK oder META) und zum anderen statistische Verfahren (wie z.B. Multicase oder Leadscope).

Eine Zwischenstellung nehmen Gruppenbeitragsmethoden ein (Boethling und Mackay 2000). Bei regelbasierten Systemen werden empirische Regeln, die von Experten aufgestellt bzw. geprüft wurden, mittels Computern systematisiert und angewendet, um die Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Eigenschaften vorherzusagen. Wesentliche Basis dafür ist das Vorhandensein oder die Abwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen in einem Molekül, von denen bekannt ist, dass sie z.B. für eine bestimmte Wirkung verantwortlich sind. Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass es i.d.R. Vorstellungen zum Mechanismus der Wirkung gibt. Nachteil ist,

dass der Erfahrungsraum nicht mit Hilfe des Expertensystems erweitert werden kann, da die Prädikation ja auf bereits bekannten Regeln beruht, also eine bestimmte Breite der Datenbasis benötigt.

Im Fall der statistischen Herangehensweise ist es zwar ebenfalls erwünscht, eine mechanistische Basis zu haben (s. Validitätskriterien der OECD für QSAR) – dies ist aber nicht immer gegeben. Vielmehr werden nach unterschiedlichen statistischen Methoden Wirkungen und Strukturelemente eines chemischen Moleküls korreliert. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass aus dem System heraus kein Wirkmechanismus abgeleitet werden kann, sondern weiteres Expertenwissen notwendig ist. Ein Vorteil ist jedoch, dass durch Induktion neue Hypothesen über molekulare Eigenschaften erstellt werden, wie z.B. die Bioverfügbarkeit oder die Fähigkeit einer Substanz, die Funktion eines bestimmten Proteins im Organismus zu hemmen oder zu verstärken („Erweiterung des Erkenntnisraums“). Für alle Herangehensweisen ist jedoch zentral, dass davon ausgegangen wird, dass i.a. ähnliche Moleküle (oder zumindest ähnliche molekulare Teilstrukturen) zu ähnlichen Wirkungen führen und dass es eine gewisse experimentelle Datenbasis geben muss, um aussagekräftige und verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Wichtiges Kriterium für Daten, die zur Modellbildung verwendet werden sollen, ist, dass sie alle aus einer einheitlichen Serie (standardisiertes Testprotokoll, gleicher Endpunkt) stammen.

#### 4.3.3 Ähnlichkeit von Molekülen

Die Dimensionen des chemischen Strukturraums sind unvorstellbar groß: Mit der Gesamtzahl aller denkbaren chemischen Strukturen enthält er schätzungsweise bis zu 10<sup>160</sup> unterschiedliche Moleküle. Doch nur ein geringer Teil davon, aber absolut betrachtet immer noch eine enorme Zahl - laut Schätzungen 10<sup>60</sup> Moleküle - eignet sich möglicherweise als Wirkstoffe. Diese Inseln biologischer Aktivität im Ozean aller potenziellen Verbindungen ausfindig zu machen, gestaltet sich schwierig. Die Bedeutung des Konzepts der Ähnlichkeit von Molekülen ist dabei von großer Bedeutung, da es erlaubt, Moleküle gemäß ihren physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften zu gruppieren und dies zu nutzen, um Eigenschaften von Molekülen vorherzusagen. Grundlage dieser Herangehensweise ist also die oben erwähnte Annahme, dass ähnliche Moleküle auch ähnliche Eigenschaften haben (Johnson und Maggiora 1990). Dies ist die grundlegende Annahme für jedes Drug-Design und jeder Vorhersage der Eigenschaften also auch der Toxizität von Molekülen. Das grundlegende Problem besteht jedoch einerseits darin, dass ein (quantitativer) Zusammenhang zwischen einer Eigenschaft und der molekularen Struktur nicht linear ist (s. Abb. 1) und es andererseits keine eindeutige Definition und kein einfaches Maß für die Ähnlichkeit von Molekülen gibt. Nicht zuletzt die Frage des effizienten Auffindens neuer Leitstrukturen in der pharmazeutischen Forschung hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass Methoden, die auf der Ähnlichkeit von Molekülen beruhen, eine breite Anwendung finden.

In der Statistik, insbesondere der multivariaten Statistik, interessiert man sich für die Messung der Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Objekten und definiert dazu sogenannte Ähnlichkeits- oder auch Distanzmaße. Es handelt sich dabei aber nicht um ein Maß im mathematischen Sinne, der Begriff „Maß“ bezieht sich damit ausschließlich auf die Messung einer bestimmten Größe. Im Bereich der Chemieinformatik wird die Frage der Ähnlichkeit oft mit der Frage verbunden, wo ein bestimmtes Molekül

sich in dem Raum, den alle Moleküle aufspannen, befindet. Die Frage nach der Ähnlichkeit von Molekülen ist auch von zentraler Bedeutung, um die Qualität einer Prädiktion zu beurteilen. Moleküle, die sich nicht im Raum der Moleküle (Anwendungsbe- reich, Anwendungsdomäne, engl. „Applicability Domain“) befinden, die durch die vorhandenen Moleküle aufgespannt wird, können mit einem gegebenen Modell nicht (gut) vorhergesagt werden. Ein einfaches Beispiel ist, dass mit einem Modell, das für einen bestimmten Endpunkt nur lineare Alkohole als Datenbasis enthält, die Vorher- sage dieses Endpunktes von verzweigten Alkoholen hinsichtlich ihrer Validität genau zu betrachten ist und natürlich für Carbonsäuren oder gar Aromaten keine validen Ergebnisse erwarten lässt. Sehr viel komplexer ist die Angelegenheit, wenn es um die hier vorliegende Fragestellung geht (s. z.B. die strukturisomeren Furane der Ta- belle 4-1 und Tabelle 4-3). Hier kommt das empirische Expertenwissen ohne die Nutzung computerbasierter Expertensysteme schnell an seine Grenzen – und umge- kehrt.

Idealerweise verhalten sich als ähnlich klassifizierte Moleküle auch ähnlich hinsicht- lich aller chemisch-physikalischen und biologischen Eigenschaften. Dies ist die Grundlage aller Struktureigenschaftsbeziehungen. Mit anderen Worten, solche Mole- küle befinden sich in einem möglichst eng umgrenzten Teil des chemischen Raums. Davon sind wir heute noch weit entfernt, da die verfügbaren Methoden es derzeit nur erlauben, Moleküle hinsichtlich bestimmter Eigenschaften als ähnlich zu klassifizie- ren. Die Ähnlichkeitsklassifizierung von Molekülen z.B. bei Datenbankrecherchen oder Struktureigenschaftsbeziehungen bezieht sich daher z.B. nur auf bestimmte Substrukturen, die nur die Gegenwart von spezifischen Features, nicht aber die glo- balen Eigenschaften und die Gesamtform betrachten. Im Gegensatz dazu ist das auf Ähnlichkeit basierende Suchen nach bzgl. der Wirkung ähnlichen Molekülen umfas- sender, indem sie abstraktere Repräsentationen von Molekülen und Eigenschaften nutzen (z.B. Oberflächenpolarität) als das teilstrukturbasierte Suchen. Die Berechnungen der Ähnlichkeiten von Molekülen erfolgt in drei Schritten: 1. Repräsentation des Moleküls im Deskriptorraum, 2. Eigenschaftsauswahl, 3. Vergleich.

Für die Repräsentation von Molekülen gibt es eine große Zahl Möglichkeiten (s. z.B. Gasteiger und Engels 2003, Todescini und Casonni 2009), von denen hier nur eini- ge wenige genannt werden sollen wie z.B. eindimensionale Deskriptoren. In diesem Fall wird dem Molekül nur eine Zahl zugeordnet wie z.B. physiko-chemische Eigen- schaften (z.B. Wasserlöslichkeit) oder die Unterscheidung von Arzneimittelwirk- stoffen und Nichtarzneimittelwirkstoffen (s. z.B. Lipinski Rule of Five: Lipinski et al. 1997, Lipinski et al. 2001). Geometrische Informationen sind nicht enthalten, sie ge- hören zu den zweidimensionalen Deskriptoren wie die topologische Deskriptoren (graphentheoriebasierte Deskriptoren wie z.B. Atomreihenfolgen und –verknüp- fungen) oder fragmentbasierte (teilstrukturbasierte) Deskriptoren (Free und Wilson 1964, Cammer et al. 1974), in die z.T. elektronische und Valenzzustandsinfor- mationen integriert werden („elektrotopologische Deskriptoren, Hall und Kier 1995). Bath (1994) stellte fest, dass bei der Verwendung von Molekülfragmenten mit vier Schweratomen (alle Atome des Fragments ohne Wasserstoffatome) oft am besten geeignet sind. Moderne Methoden nutzen zur Beschreibung eines Moleküls bei die- ser Methode aber nicht nur eine Substruktur, sondern verschieden kleine Teile, die chemisch nicht unbedingt funktionelle Gruppen darstellen müssen (z.B. Multicase).

Moleküle werden normalerweise verglichen, indem z.B. Ähnlichkeitskoeffizienten be- nutzt werden, von denen es mehrere Dutzend gibt. Grundtypen sind Assoziation ba-

siert auf Fragmenten, z.B. Tanimoto-Koeffizient, Korrelation (z.B. Pearson-Koeffizient), Entfernung (z.B. euklidischer Abstand). Eine andere Möglichkeit sind Methoden, die auf maschinellem Lernen beruhen wie z.B. künstliche neuronale Netzwerke oder Support Vector-Maschinen.

Im Gegensatz zu 2D-QSAR kombiniert beispielsweise 3D-QSAR den „normalen“ Ansatz, der auf der Ähnlichkeit von Molekülen (s.u.) basiert, mit der Geometrie und kann deshalb auch Ähnlichkeiten zwischen nicht-gerüstverwandten, aber funktionsverwandten Molekülen erkennen. Der Grundgedanke der Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) ist, anstelle von Strukturen Eigenschaftsfelder von Molekülen zu vergleichen, die durch ihre Wechselwirkung mit anderen Molekülen entstehen.

Nach der Intuition des Chemikers werden Moleküle z.B. aufgrund des Vorhandenseins bestimmter funktioneller Gruppen als ähnlich klassifiziert. Im vorliegenden Zusammenhang werden Moleküle mithilfe weitergehender Kriterien bezüglich ihrer Ähnlichkeit klassifiziert, indem weitere Eigenschaften und Parameter wie elektronische Zustände oder Oberflächenpolarität etc. einbezogen werden, die für eine erwünschte oder unerwünschte Wirkung von Bedeutung sind.

#### 4.3.4 Mechanismen, Validierungsaspekte, Verfügbarkeit von Modellen

Die obigen Ausführungen zeigen, dass nichttoxikologische Endpunkte grundsätzlich zur Prädikation geeignet sind. Letztlich braucht es nur experimentelle Daten ausreichender Qualität, die alle unter gleichem experimentellem Design standardisiert erhoben wurden und die mit einer chemischen Struktur korreliert werden können. Für solche Modelle würde bisher vor allem in der Arzneimittelentwicklung und -optimierung Bedarf gesehen, weniger im Bereich der Umwelttoxikologie. Beispiele gibt es von einigen Herstellern (z.B. Multicase, Leadscope für Herzleistungsparameter). In der Praxis sind solche Modelle jedoch bisher nicht allgemein verfügbar, da ähnlich wie bei den hier untersuchten Endpunkten aus verschiedenen Gründen nicht ausreichend viele experimentelle Daten in der notwendigen Qualität eines einheitlichen experimentellen Settings zur Verfügung stehen. Dass bzgl. eines gegebenen Endpunktes aktive Stoffe über einen ähnlichen Mechanismus wirken, liegt den QSAR-Modellen zugrunde und ist ein OECD Validitätskriterium. Unerwartete Ergebnisse bei der Validierung (Selbstvalidierung, Crossvalidierung, externe Validierung) können u.a. an einem anderen Wirkmechanismus liegen. Wenn bei einer Prädikation ein aus Expertensicht unerwartetes Ergebnis resultiert, ist dies Anlass, u.a. die Frage nach Wirkmechanismen zu stellen. Umgekehrt betrachtet lassen sich QSAR daher auch als Explorationswerkzeug nutzen. Gute Softwarepakete machen daher neben der eigentlichen Prädikation Angaben zur Anwendungsdomäne, zur Verlässlichkeit der Prädikation und prüfen beispielsweise, ob unspezifische Toxizität bzw. Nichttoxizität z.B. auf zu geringer Löslichkeit oder Effekten beruhen, die einfach nur mit der Fettlöslichkeit bzw. dem  $\log P_{OW}$  einer chemischen Verbindung korrelieren (siehe Multicase). Darüber hinaus werden oft die für eine spezifische Wirkung verantwortlichen Parameter (z.B. Teilstrukturen, entscheidende Deskriptoren des Modells wie bei Multicase oder Leadscope) oder Regeln (z.B. Derek) ausgeworfen, was dem Experten weitere Hinweise zur Validität und Bewertung der Ergebnisse an die Hand gibt.

#### 4.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Die hier genauer untersuchten kommerziellen Softwaremodelle sind die derzeit wichtigsten am Markt verfügbaren. Darüber hinaus gibt es welche, die aus der öffentlich finanzierten Forschung z.B. als Werkzeuge zur Stoffbewertung im Kontext von REACH entwickelt wurden. Sie verlaufen sowohl softwareseitig als auch von der grundsätzlichen Herangehensweise und den verwendeten Parametern unterschiedliche Ansätze. Die innerhalb der einzelnen QSAR-Softwarepakete verfügbaren Modelle decken die hier betrachteten Endpunkte (Neurodegeneration und verzögerte allergische Reaktion) nicht ab. Auch die breiter definierten Endpunkte (Neurotoxizität und Immuntoxizität als Annäherung) sind meist (noch) nicht durch QSAR-Modelle zugänglich. Ein Grund hierfür ist sicher das Fehlen einer ausreichenden Menge experimenteller Daten ausreichender Qualität ein und desselben experimentellen Settings. Dies ist auch die derzeit entscheidende Hürde für die Erarbeitung von Modellen, die eine Prädikation des Einflusses von Chemikalien auf biochemische Parameter erlauben würden. Es liegen demnach derzeit weder hinreichende substanzspezifische experimentelle Tests vor, um die postulierten Wirkungen überprüfen zu können, noch kann mit Hilfe von QSAR-Prädikationen die Relevanz von Chemikalien bzgl. der hier betrachteten Wirkungen überprüft werden.

Für die Neurodegeneration und verzögerte allergische Reaktion sind keine QSAR-Modelle verfügbar und damit keine entsprechenden Prädikationen möglich. Somit kann die Abschnitt 2 dieses Projekts abgeleitete und auf mechanistischen Überlegungen beruhende Hypothese nicht durch QSAR abgesichert werden, obwohl gute QSAR-Modelle auch eine mechanistische Hypothese unterstützen können bzw. zur guten Dateninterpretation eine solche erfordern, welche sich u.a. in der Auswahl der experimentellen Daten wiederfindet, die zur Modellbildung herangezogen werden.

Als Surrogatendpunkte für die betrachtete Wirkung (Neurotoxizität/Michael-Akzeptoreigenschaften für Neurodegeneration bzw. Immuntoxizität für (verzögerte) allergische Reaktionen) sind vereinzelt Modelle verfügbar, insbesondere für Neurotoxizität z. T. sogar über die U.S.-FDA validierte (Leadscope). Die für die Neurotoxizität durchgeführten Prädikationen legen allerdings nahe, dass die hier ausschließlich betrachteten Furanderivate aus verschiedenen Gründen wohl eher keine Michael-Akzeptoren sind. Der Furanring, auch mit Keto- und Alkenstrukturen in der Seitenkette, ist aufgrund seines aromatischen Charakters nicht aktiv: Michael-Akzeptoren sind keine vorhanden, wenn man berücksichtigt, dass die Doppelbindungen des Furans nur formal Teil eines Michael-Systems sind. De facto sind sie Teil eines aromatischen Systems. Dessen notwendige Aufhebung ist letztlich der Grund für eine stark reduzierte Reaktivität. Die ist die rein chemische Sicht. Realiter handelt es sich jedoch um von Enzymen in Zellen katalysierte Reaktionen, so dass diese Interpretation Einschränkungen unterliegen kann. Inwieweit eine Ausweitung auf  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Moleküle, bei denen das Michael-System nicht Teil einer aromatischen Teilstruktur ist, hier neue Erkenntnisse bringen kann, muss an dieser Stelle offen bleiben.

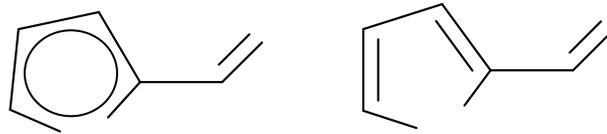


Abbildung 4-3: Furanderivate als aromatisches System (links) und in Doppelbindungsschreibweise (rechts)

Es wird empfohlen, in Ergänzung der hier vorgelegten Ergebnisse mit Hilfe der Software Multicase und Leadscope, die möglichen und erfolgversprechenden Prädikationen im Falle vorhandener Modelle – insbesondere zur Neurotoxizität ggf. noch durchzuführen. Damit kann das hier vorläufig erarbeitete Ergebnis, dass die Verbindungen der Tabelle 4-1 und Tabelle 4-3 als Furanderivate sich nicht wie klassische Michael-Akzeptoren verhalten, weiter untermauert werden soll („Negativkontrolle“).

Nach Ansicht eines befragten Toxikologen aus der Industrie ist der Wirkmechanismus zur Neurodegeneration noch zu wenig abgesichert, um im Rahmen der regulatorischen Toxikologie in Form von QSAR Verwendung zu finden. Ähnliches könnte für verzögerte allergische Reaktionen gelten. Eine Verwendung im Rahmen der regulatorischen Toxikologie (z.B. bei der Optimierung von Arzneimittelwirkstoffen) ist jedoch ein wesentlicher Treiber für die Entwicklung von QSAR Modellen. Für die Prädikation von Immuntoxizität und (verzögerte) allergische Reaktionen befinden sich bei einigen Herstellern Module in der Entwicklung, ebenso für „Passage der Blut-Hirn-Schranke“. Damit sind sich für die nähere Zukunft vom Grundsatz her Prädikationsmöglichkeiten zumindest für diese („Ersatz“) Endpunkte zu erwarten.

Aufbauend auf den in diesem Bericht dokumentierten Ergebnissen wird empfohlen, z.B. mit Modellen der kommerziellen Anbieter Leadscope und Multicase Berechnungen für die hier untersuchten Endpunkte bzw. „Ersatzendpunkte“ durchzuführen, sobald die entsprechenden sich derzeit in der Entwicklung befindlichen Modelle verfügbar sind.

## 5 Risikoabschätzung unter Berücksichtigung von Toxizitätspfaden: Forschungsaktivitäten, Ansätze zur regulatorischen Umsetzung und Grenzen

### 5.1 Die derzeitige Bedeutung mechanistischer Ansätze in der regulatorischen Toxikologie

Die meisten derzeit vorliegenden OECD-Tests zur Charakterisierung der toxikologischen Eigenschaften einer Substanz sind endpunktorientiert und belassen den Mechanismus als „black box“. Die Anforderungen nach Anhang VIII-X (REACH) sind in der Mehrzahl über Wirkungstests abzudecken. Es gibt jedoch zu einzelnen Endpunkten auch mechanismusorientierte Tests:

Ein solcher Test ist der lokale Lymphknotentest an der Maus (local lymph node assay, LLNA, OECD TG 429). Nach Applikation der Prüfsubstanz in das Ohr des Tieres wird die Anzahl der T-Zellen in den Lymphknoten nach einer gewissen Zeit bestimmt und mit der von Kontrolltieren verglichen. Die Proliferation von T-Zellen innerhalb der Substanz behandelten Maus wird als ein erster Schritt hin zur Sensibilisierung und späteren Auslösung einer Allergie angesehen (siehe „Type I hypersensitivity“ (WHO, 1999)). Die Entwicklung und der Read-out dieses Test beruhen also auf dem Mechanismus, welcher dem pathophysiologischen Effekt zugrunde liegt. Ein Nachteil des Tests ist jedoch, dass die Verwendung von Versuchstieren aus den klassischen Tests (z.B. Böhler oder dem Meerschweinchen Maximierungstest (GPM)) durch das Ersatzverfahren nicht gänzlich abgeschafft wird, sondern wiederum auf Tierexperimenten basiert.

Auf anderen Gebieten gibt es jedoch bereits regulatorisch anerkannte und standardisierte *in vitro* Ersatzmethoden zum Tierversuch. So zum Beispiel im Bereich der Phototoxizität (z.B. 3T3 NRU Test, OECD TG 432). Der 3T3 NRU Test untersucht potenzielle phototoxische Eigenschaften (d.h. Toxizität nach Einwirkung von Licht) von Substanzen an einer murinen Fibroblastenzelllinie (Balb/c 3T3). Dabei wird der Einfluss der Prüfsubstanz auf das Überleben der Zellen, einerseits unter Einwirkung von UV-Strahlung und andererseits in Abwesenheit des Lichteinfalls, verglichen. Wird ein solcher Test im Rahmen einer sequentiellen Prüfstrategie eingesetzt, so bedeutet dies im Fall eines negativen Ergebnis, dass keine weiteren Tests erforderlich sind. Tierexperimentelle Untersuchungen werden somit vermieden (siehe dazu auch das Vorgehen innerhalb der vorgeschriebenen Prüfstrategie nach REACH).

Durch Einsatz ganzer Testbatterien (Kombination verschiedener Tests) kann auch eine fehlende Genotoxizität einer Substanz aus reichend sicher behauptet werden, ohne Tierversuche durchzuführen. Zunächst wird die Fähigkeit einer Substanz, eine Mutation zu induzieren, im Ames-Test (Bakterienrückmutationstest, OECD TG 471) betrachtet. Anschließend folgt die Untersuchung des Potentials zur Induktion von Chromosomenaberrationen (Chromosomenaberrationstest an Säugerzellen, OECD 473 oder *in vitro* Mikrokerntest, OECD TG 487) und zuletzt werden die zytogenetischen Veränderungen in Säugerzellen im TK (Thymidin-Kinase), H PRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) oder X PRT (Xanthin- usw.) Test verfolgt. Sind all diese Test mit und ohne metabolische Aktivierung der Prüfsubstanz negativ ausgefallen, so benötigt man im Rahmen von REACH keine zusätzlichen tierexperimentellen Informationen. Die Tests geben jeweils auch Hinweise auf den Mechanismus der Genotoxizität.

Innerhalb der Europäischen Union werden die Anstrengungen zur Vermeidung von Tierversuchen und zur Standardisierung angewandter Methoden mit dem Fokus zur regulatorischen Anwendbarkeit in der Chemikalienprüfung, in einer Datenbank am „Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)“ des „Joint Research Centre“ (JRC) gesammelt (<http://ecvam.jrc.it/>). Der Aufwand, welcher hierfür betrieben wird, unterstreicht die Wichtigkeit der Bemühungen, die in Richtung mechanistischer Ansätze unternommen werden. Tabelle 5-1 gibt einen Überblick zu derzeit validierten Ersatztests, wobei nicht immer davon ausgegangen werden kann, dass diese den Wirkungsmechanismus betreffen und dass diese ohne tierexperimentelle Untersuchungen auskommen.

Tabelle 5-1: Validierte alternative Testverfahren in der EU

Wissenschaftlich validierte alternative Methoden gibt es nach <a href="http://ecvam.jrc.it/">http://ecvam.jrc.it/</a> zu den Endpunkten:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Acute aquatic toxicity</u></li> <li>• <u>Acute oral toxicity</u></li> <li>• <u>Eye irritation</u></li> <li>• <u>Genotoxicity</u></li> <li>• <u>Monoclonal antibodies production</u></li> <li>• <u>Haematotoxicity</u></li> <li>• <u>Phototoxicity</u></li> <li>• <u>Pyrogenicity</u></li> <li>• <u>Reproductive and developmental toxicity</u></li> <li>• <u>Skin corrosion</u></li> <li>• <u>Skin irritation</u></li> <li>• <u>Skin sensitisation</u></li> <li>• <u>Vaccines: potency and safety testing</u></li> </ul>
<p><u>Zum Stand der Validierung im Einzelnen:</u>  <a href="http://tsar.jrc.ec.europa.eu/">http://tsar.jrc.ec.europa.eu/</a></p>

Von Seiten der Gesetzgebung wird gefordert, solche alternativen, mechanistischen Ansätze zu suchen und anzuwenden (siehe REACH). Dies wird innerhalb der Forschung mittels langwieriger Forschungsbemühungen in zunehmendem Maße umgesetzt. Die weitere Entwicklung mechanistisch basierter, schnell durchzuführender

Testbatterien wird nötig sein, um den regulatorischen Anforderungen gerecht zu werden.

*In vitro* Versuche werden im Moment häufig zu „**screening**“ **Zwecken** (ähnlich wie sie aus der Prüfung neuer Wirkstoffe in Hochdurchsatzverfahren in der Pharmaindustrie bekannt sind) benutzt. Teilweise werden diese Verfahren jedoch auch eingesetzt, um die Wirkmechanismen aufzuklären oder besser zu verstehen. Im Umkehrschluss heißt das, dass es ebenfalls möglich ist, mechanistisch basierte Tests zur Erfassung früher Veränderungen innerhalb eines Toxizitätspfad zu entwickeln, wenn der Mechanismus aufgeklärt ist. Ergebnisse aus bereits angewendeten *in vitro* Untersuchungen leisten einen wertvollen Beitrag, um eine breite Datengrundlage für regulatorische Entscheidungsfindungen zu schaffen. Sie reichen in den meisten Fällen jedoch nicht aus, um den Tierversuch zu ersetzen. Der Großteil dieser Tests ist noch nicht validiert und ihr regulatorischer Stellenwert somit nicht festgelegt.

Weitere *in vitro* Versuche (z.B.) mit Leberzellen werden verwendet, um erste Hinweise auf eine mögliche Biotransformation zu sammeln (da diese hauptsächlich in der Leber stattfindet). Solche Versuche schließen die Verwendung von Primärzellkulturen mit ein. Die Zellen werden aus tierischem oder humanen (Operations-) Material gewonnen (nur für kurze Zeit in Kultur zu halten, sehr eng am natürlichen Verhalten) oder immortalisierten Zelllinien (Vorteil: lange in Kultur zu halten, jedoch trotzdem zweite Wahl, aufgrund der Veränderungen durch die Immortalisierung). Die in Kultur befindlichen Leberzellen können verwendet werden, um Untersuchungen zum Metabolismus einer Substanz durchzuführen. In der Arzneimittelentwicklung spielt der Vergleich der Ergebnisse eine große Rolle. Daraus ergeben sich Hinweise, ob die Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen für die zu untersuchende Substanz aufgrund ähnlicher Biotransformation überhaupt gegeben ist („metabolic pattern“) (Zusammenfassung siehe Schleger, 2001; Reichl und Schwenk, 2004).

Weiter kann die Verwendung von Zellkulturen auch Aufschluss über die Zytotoxizität einer Substanz für eine bestimmte Zellart geben (beispielsweise in Zusammenhang mit Vorinformationen aus *in vivo* Versuchen und einer dort beobachteten spezifischen Organtoxizität). Man kann dabei z.B. die Freisetzung von Enzymen in den Überstand prüfen (entspricht der Diagnostik beim Menschen). Wird z.B. im Blut ein erhöhter Wert der Alanin Aminotransferase (ALT) nach Substanzexposition gefunden, so wird dies als Indikator für eine Lebertoxizität gesehen. Auf diesem Hintergrund gibt es Hochdurchsatzverfahren zur Erfassung solcher Enzymaktivität im Zellüberstand (Metabonomics). Die Lebensfähigkeit von Zellen kann aber auch anhand der Umsetzung eines zugegebenen Substrats durch mitochondriale Enzyme bestimmt werden (z.B. MTT-Test). Zeigt eine Substanz solche zytotoxischen Effekte, sollte eine genauere Risikobewertung erfolgen (Zusammenfassung siehe Schleger, 2001; Reichl und Schwenk, 2004).

## 5.2 Vergleichende toxikogenomische Datenbank

Die Comparative Toxicogenomics Database CTD (CTD; <http://ctd.mdibl.org/>) stellt ein wichtiges Werkzeug dar, mit dem beispielsweise Gene identifiziert werden können, die eine Wechselwirkung mit einer bestimmten Chemikalie eingehen. Ferner werden die mit einer solchen Wechselwirkung assoziierten Krankheiten ausgegeben, so dass ein möglicher (wenngleich oftmals indirekt abgeleiteter) Zusammenhang

zwischen einer Chemikalie und einer Krankheit ausgewiesen wird. Als Datengrundlage dienen in der Literaturdatenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) der U.S. National Library of Medicine (NLM) aufgenommene Zeitschriftenartikel. Zudem wird für direkte Beziehungen (zu direkten und abgeleiteten Beziehungen, s.u.) zwischen einem Gen und einer Krankheit die NLM-Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>) und für Informationen zum Signaltransduktionsweg („Pathways“) das KEGG-System (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) herangezogen.

Der Umfang und die Komplexität der Datenbank schließen eine vollständige Besprechung im Rahmen dieses Projektes aus. Vielmehr sollen einzelne Konzepte und die Einsatzmöglichkeiten beispielhaft erläutert werden.

Gute und umfassende Überblicke bieten Mattingly et al. (2006) und Davis et al. (2009), auf denen auch die folgende, kurze maßgeblich Beschreibung basiert.

Die Datenbank wird monatlich aktualisiert und enthält zur Zeit (Stand: Oktober 2009) beispielsweise etwa:

- 195.000 Beziehungen zwischen Chemikalien und Krankheiten
- 190.000 Wechselwirkungen zwischen Chemikalien und Genen
- 670.000 Beziehungen zwischen Genen und Krankheiten

In Abschnitt 2.3 haben wir die Informationen aus dieser Datenbank bereits genutzt, um (a) den Mechanismus bei der neurotoxischen Wirkung von Blei über Daten aus der Genanalyse zu erläutern, (b) möglicherweise ähnlich wirkende Substanzen zu finden wie aus der Ähnlichkeit in der veränderten Genexpression nahegelegt und (c) damit Anhaltspunkte für eine Interaktion im Gemisch zu erhalten.

### Datenorganisation und Konzepte

Einer der großen Vorteile der CTD besteht darin, dass ein großer Aufwand bei der Datenaufbereitung betrieben wurde, beispielsweise um das verwendete Vokabular zu vereinheitlichen und (hierarchisch) zu organisieren. Der Vorgang wird als „curation“ bezeichnet, was im Wesentlichen die Organisation und das Management der Daten bezeichnet (durchaus angelehnt an den Museumskurator, der entscheidet, wie die Ausstellungsstücke („Daten“) organisiert und ausgestellt werden sollen). Ein solcher Vorgang ist prinzipiell immer bei der Verarbeitung großer Datenmengen notwendig, damit die Informationen verlässlich auffindbar sind.

Für die CTD wurden die Konzepte „Gen“ und „Chemikalie“ neu organisiert und für die Suche in PubMed aufbereitet („curated“). Dies beinhaltet beispielsweise folgende Schritte:

- Vereinheitlichung der Genbezeichnung: wengleich bei der Bezeichnung von Genen verschiedene Anstrengungen zur Vereinheitlichung unternommen wurden, verwenden Autoren den noch oftmals unterschiedliche Bezeichnungen oder Schreibweisen. So wird z.B. das Gen „Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1“ wahlweise als CYP1A1 (die bevorzugte Schreibweise nach Human Genome Organization), CYP 1A1, CYP1 A1 usw. bezeichnet.
- Negativlisten: ein weiteres Problem besteht darin, dass ein Begriff verschiedene Bedeutungen haben kann. So kann AHR das Gen für den menschlichen „aryl

hydrocarbon receptor“ beschreiben (in diesem Kontext gesuchte Bedeutung), die Abkürzung kann aber auch für „airway hyperresponsiveness“ oder „adjusted hazard ratio“ stehen. Daher wurde für jedes Gen eine Negativliste angelegt, die bei der Suche berücksichtigt wurde. Wenn beispielsweise bei der Suche nach AHR ein Literaturzitat gefunden, das zudem irgendein Begriff der Negativliste enthielt, wurde dieses Zitat nicht in die Datenbank aufgenommen. Analog wurde für Chemikalien vorgegangen

- Ausschlüsse von Datensätzen: Viele in CTD enthaltene Chemikalien haben Synonyme, die mittels MeSH („medical sub-headings“) der U.S. National Library of Medicine (NLM) erschlossen wurden. Auch hier besteht das Problem darin, manche Begriffe mehrdeutig sind. So ist beispielsweise „metric“ ein Synonym (genauer: ein Markenname) für den Arzneimittelwirkstoff Metronidazol, heißt im Englischen aber eben auch metrisch.

Der Begriff der „curation“ geht in CTD allerdings noch deutlich weiter. So werden beispielsweise die nach der Suche und Prozessierung erhaltenen Datensätze von „Kuratoren“ (z.T. auch als „Biokuratoren“ bezeichnet) vor der Aufnahme in die Datenbank einem review-Prozess unterzogen. Hierbei wird beispielsweise die Art der Interaktion näher beschrieben (z.B. Substanz A bindet an XY-Rezeptor). Die Kuratoren ziehen hierzu den Abstract und – wenn nötig – auch den Volltext des Artikels heran. Ob eine Referenz auf diese Art ausgewertet („curated“) wurde, wird in der Datenbank bei der Referenz angegeben.

In diesem Kontext ist es wichtig, sich den Unterschied zwischen direkten („direct“) und abgeleiteten („inferred“) Beziehungen zu vergegenwärtigen:

- Direkte Hinweise („direct evidence“) zwischen Chemikalie und Krankheit wurden von den Kuratoren aus der Literatur ermittelt und werden in der Datenbank auch als „curated“ bezeichnet. Wenn beispielsweise Substanz A im Tierversuch Tumoren der Leber erzeugt, bestehen „direkte Hinweise“ zwischen Substanz A und Leberkrebs.
- In CTD abgeleitet („CTD inference“) bedeutet, dass z.B. Chemikalie A mit Gen C wechselwirkt und Gen C eine direkte Beziehung mit Krankheit B hat. Chemikalie A hat dann eine abgeleitete Beziehung mit Krankheit B.

## Einsatzmöglichkeiten

Die Datenbank bietet eine Fülle von verschiedenen Suchoptionen und Werkzeugen und die Ergebnisse beinhalten vielfältige Verknüpfungen (bis hin zu dem zugrunde liegenden PubMed-Eintrag). Prinzipiell bietet CTD die Möglichkeit, über die verschiedenen Beziehungen Hinweise auf mögliche durch Chemikalien vermittelte Krankheiten zu erhalten und ist in dieser Form sicher einzigartig. Allein durch die Eingabe des Chemikaliennamens erhält man nach wenigen Mausklicks eine Liste möglicher, mit dieser Chemikalie assoziierter Krankheiten. Wenn gleich viele dieser Assoziationen indirekter Natur sind, können sie als Hinweise für eine weitere Recherche dienen. Ebenso kann die Recherche in der Datenbank Hinweise auf molekulare Mechanismen geben, sei es für bislang nicht mit der Chemikalie in Zusammenhang gebrachte Krankheiten, sei es für bekannte Endpunkte, für die aber bislang keine mechanistischen Informationen vorliegen. Bedeutend ist hierbei der Umstand, dass diese Hinweise auf andere Weise in der Regel nicht zu erhalten gewesen wären. Daneben

bietet die Datenbank zahlreiche weitere Möglichkeiten. Beispielsweise kann man mit dem „VennViewer“ vergleichen, welche Gene einheitlich durch verwandte Substanzen (es können maximal 3 verglichen werden) angesprochen werden und welche Krankheiten damit potentiell verbunden sind. Diese Informationen könnten für eine Bewertung der Effekte von Gemischen eine Bedeutung erlangen. Für Benzol, Toluol und Ethylbenzol werden folgende Wechselwirkungen mit Genen bzw. erhalten.

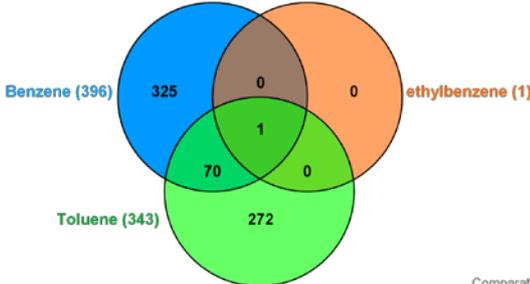
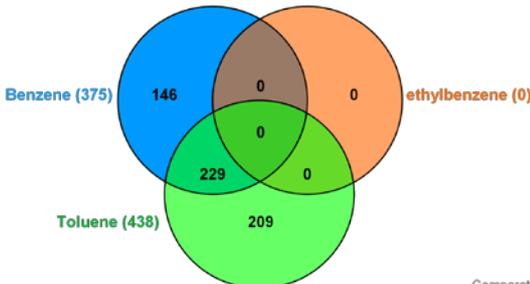
<b>Wechselwirkungen mit Genen</b>	<p style="text-align: center;"><b>Common curated genes</b></p>  <p style="text-align: right; font-size: small;">Comparative Toxicogenomics Database, 2009 Nov 5.</p>
<b>Abgeleitete Beziehungen mit Krankheiten</b>	<p style="text-align: center;"><b>Common inferred diseases</b></p>  <p style="text-align: right; font-size: small;">Comparative Toxicogenomics Database, 2009 Nov 5.</p>
<b>Direkte Hinweise auf Krankheiten</b>	<p style="text-align: center;"><b>Common curated diseases</b></p>  <p style="text-align: right; font-size: small;">Comparative Toxicogenomics Database, 2009 Nov 5.</p>

Abbildung 5-1: Ergebnisdarstellung für Überschneidung für Benzol, Toluol und Ethylbenzol

Dieses Beispiel veranschaulicht einige der unterschiedlichen Recherchemöglichkeiten der CTD-Datenbank. Die Ergebnisse lassen sich detailliert analysieren und die Datenbasis kann bis zur zugrunde liegenden Literatur zurückverfolgt werden.

Verfolgt man beispielsweise die Daten für Benzol weiter so lassen sich aus allen mit Benzol assoziierten Krankheiten die 14 mit direkten Hinweisen (in der folgenden Abbildung haben sie einen Eintrag „M“ in der entsprechenden Spalte).

The screenshot shows the CTD interface for Benzene. The table below summarizes the data presented in the image.

Disease	Direct Evidence	CTD Inference	References
Breast Neoplasms	M	Via 27 genes: BCL2; BRCA2; CASP8; CCND1; CSF2; CSF3; CYP1A1; EGFR; FASN; FGFR2; FOS; HHEX; HIST1H1C; HP; IL8; JUN; KRAS; NFKBIA; NQO1; NR2F6; PIM1; PTEN; RAD51; RGS2; TNF; TP53; TRP53	[E]
Leukemia	M	Via 7 genes: BAD; BCL2; CCND1; GSTM1; HP; IL2; PTEN	[E]
Occupational Diseases	M	Via 6 genes: CYP1A1; CYP2D6; ERCC2; MPO; NQO1; XRCC1	[E]
Multiple Myeloma	M	Via 5 genes: CCL2; CCND1; EPHX1; GSTT1; NQO1	[E]
Hypertension	M	Via 3 genes: CD36; ECE1; HP	[E]
Anemia, Aplastic	M	Via 1 gene: IFNG	[E]
Dermatitis	M	Via 1 gene: PLA2G4A	[E]
Leukemia, Myeloid	M	Via 1 gene: NQO1	[E]
Thymus Neoplasms	M	Via 1 gene: TRP53	[E]
Bone Marrow Diseases	M		[E]
Hematologic Diseases	M		[E]
Leukemia, Myeloid, Acute	M		[E]
Lung Diseases, Interstitial	M		[E]
Lymphoma	M		[E]
Prostatic Neoplasms	M	Via 46 genes: ANXA3; BAD; BAX; BCL2; BNIP3; BRCA2; CASP9; CCND1; CDKN1A; CXCL12; CYP1A1; CYP2E1; DNAJC3; EGFR; EGR1; EPHX1; ERCC2; GJA1; GSK3B; GSTM1; GSTP1; GSTT1; IGFBP3; IL10; IL16; IL2; IL8; INADL; LEL; MYC; NAT2; NBN; NQO1; NR3C1; OGG1; PARP1; PDE4D; PIK3CD; PRKDC; PTEN; PTHLH; SULT1A1; TP53; UGT2B17; XRCC1; ZFAND5	[E]
Lung Neoplasms	M	Via 22 genes: BCL2L1; CASP8; CCND1; CCNG1; CDKN1A; CRP; CYP2E1; EGFR; FOS; GATA6; GJA1; GJB1; GSTP1; IL10; KRAS; MPO; MYC; PTEN; TNF; TP53; TRP53; UGT2B17	[E]
Autistic Disorder	M	Via 18 genes: BCL2; CAT; DHCR7; EGR2; GJA1; GSTM1; GSTP1; IFNG; IGFBP3; IL10; IL2; IL4; PAX6; PLA2G4A; PRLR; PTEN; TSC2; XPC	[E]
Stomach Neoplasms	M	Via 18 genes: BNIP3; CASP8; CDKN1A; EGFR; ERCC2; FADS1; EGFR2	[E]

Abbildung 5-2: Screenshot für die Beziehung Benzol-Krankheit (Ausschnitt)

Interessant bei dieser Darstellung ist auch, dass

- Krankheiten identifiziert werden können, für die neben einer abgeleiteten Beziehung auch direkte Hinweise vorliegen (die ersten 9 Einträge in obiger Liste)
- direkte Hinweise existieren können ohne dass eine abgeleitete Beziehung besteht (die Einträge 10-14 in der Ergebnisliste)

## Diskussion

Wie oben gezeigt, bietet die Datenbank mächtige Recherchemöglichkeiten und verknüpft zuvor unabhängige Daten in einzigartiger Weise. Die Aufbereitung in der Datenbank greift hierbei – trotz umfangreicher analytischer Basisdaten durch Kuratoren – auf datentechnische Verfahren zurück, die zu missverständlichen Ergebnissen führen können. Dies soll anhand eines einfachen Beispiels (Recherche für die Einzelsubstanz Methylparaben) gezeigt werden.

Unter dem Punkt Wechselwirkungen („Interactions“) findet sich für Methylparaben u.a. das folgende Ergebnis:

	<u>Interacting Chemical</u>	<u>Interacting Gene</u>	<u>Organism</u>	<u>Interaction</u>	<u>Reference</u>
1.	<a href="#">methylparaben</a>	<a href="#">AR</a>	<a href="#">Rattus norvegicus</a> (Norway rat)	methylparaben does not bind to AR protein	Fang H, et al. <a href="#">Chem Res Toxicol. 2003 Oct; 16(10): 1338-58.</a>

Abbildung 5-3: Missverständliche Ergebnisdarstellung einer Wechselwirkung in der CTD-Datenbank (Beispiel Methylparaben)

Diese Darstellung (Abbildung 5-3) verdeutlicht auf eine allgemeinere Missverständlichkeit in der Terminologie der Datenbank: Wenngleich das Ergebnis eindeutig klärt, dass die Bindung an das Protein (Androgenrezeptor, AR) untersucht wurde, wird AR unter der Überschrift „interacting gene“ geführt. Eine Wechselwirkung zwischen Methylparaben und dem AR-Gen wurde allerdings nicht untersucht. Ähnlich verhält es sich mit dem genannten Organismus: im Gegensatz zur hier genannten Ratte steht im Abstract der Quelle: *The present study developed a low cost recombinant androgen receptor (AR) competitive binding assay that uses no animals.* (Der PubMed-Eintrag dieses Artikels enthält als ein Schlagwort „Rats“, was vermutlich Grund für die obige Nennung sein dürfte). Eine Unterscheidung zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten ist auf dieser Ebene jedenfalls nicht möglich.

Im hier verwendeten Beispiel finden sich keine direkten Beziehungen zwischen Methylparaben und irgendeiner Krankheit, aber 10 abgeleitete Beziehungen, allesamt abgeleitet über das „AR-Gen“. Es ist allerdings wenig einsichtig, warum das eigentliche Ergebnis, nämlich dass Methylparaben nicht an den AR bindet, zu einer potentiell AR-vermittelten Krankheit führen soll. Für Propylparaben, das in der gleichen Studie ein positives Ergebnis liefert (Bindung an AR), werden die gleichen 10 Krankheiten als abgeleitete Beziehung ausgegeben.

Hier zeigt sich ein generelles Problem mit Begriffen wie Wechselwirkung („interaction“), Beziehung („relationship“) und Korrelation („correlation“), die in der Datenbank oder deren Beschreibung verwendet werden. Dabei wird auch eine fehlende biologische Aktivität (Methylparaben am AR) als Wechselwirkung gewertet (s. auch Bezeichnung in obiger Ergebnisdarstellung) und somit mit einer Krankheit in Beziehung gesetzt. Die Art der Wechselwirkung scheint hier keine Rolle zu spielen.

Dieses Beispiel spiegelt auch die (leicht verständliche) Tatsache wider, dass die ganz überwiegende Anzahl der Beziehungen abgeleiteter Natur sind (Stand: Oktober 2009), zum Beispiel:

- Direkte Beziehungen zwischen Chemikalien und Krankheiten (6.075; 3%)
- Abgeleitete Beziehungen zwischen Chemikalien und Krankheiten (188.541; 97%)

## Fazit

Zusammenfassend ergibt sich, dass die CTD zwar wichtige Hinweise auf mögliche chemikalienassoziierte Krankheiten liefern kann, dass diese Hinweise aber oftmals

indirekter Natur sind und die zugrunde liegenden Daten im Detail kritisch zu prüfen sind.

CTD ist nur eine, wenn auch die für toxikologische Fragestellungen bedeutendste Datenbank mit toxikogenomischen Informationen. Dies liegt nicht zuletzt an dem umfangreichen Datenmanagement in der CTD (so ist allein die Suchenach CAS-Nummern in anderen Datenbanken keine Selbstverständlichkeit). Die folgende Tabelle 5-2 enthält Verweise auf einige weitere Datenbanken. Nach der Gesellschaft für „Microarray Gene Expression“ (MGED) erfolgt hierbei eine Unterscheidung in

- primäre Quellen: hier können öffentlich Daten abgelegt werden; sie basieren auf Material, das in wissenschaftlichen Zeitschriften dokumentiert ist;
- sekundäre Quellen: sie haben einen begrenzteren Blickwinkel und erlauben keine öffentliche Ablage zusätzlicher Daten; Quelle: Williams-Devane et al., 2009).

Tabelle 5-2: Primäre und sekundäre Datenbanken mit Information zur Genexpression (Nach Angabe der Gesellschaft für „Microarray Gene Expression“ MGED sind primäre Quellen solche, bei denen öffentlich Daten abgelegt werden können und die auf Material basieren, das in wissenschaftlichen Zeitschriften dokumentiert ist; sekundäre Quellen haben einen begrenzteren Blickwinkel und erlauben keine öffentliche Ablage zusätzlicher Daten; Quelle: Williams-Devane, 2009).

Datenbank	Zugang
<b>Primäre Datenbanken</b>	
ArrayExpress (AE)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/">http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/</a>
Gene Expression Omnibus (GEO)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
Center for Information Biology Gene Expression Database (CIBEX)	<a href="http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp">http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp</a>
<b>Sekundäre Datenbanken</b>	
Environment, Drug, Gene Expression Database (EDGE)	<a href="http://edge.oncology.wisc.edu/">http://edge.oncology.wisc.edu/</a>
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	<a href="http://ctd.mdibl.org/">http://ctd.mdibl.org/</a>
Chemical Effects in Biological Systems (CEBS)	<a href="http://cebs.niehs.nih.gov/cebs-browser/cebsHome.do">http://cebs.niehs.nih.gov/cebs-browser/cebsHome.do</a>
Public Expression Profiling Resources (PEPR)	<a href="http://pepr.cnmcresearch.org/home.do">http://pepr.cnmcresearch.org/home.do</a> (under reconstruction)

### 5.3 Bericht des National Research Council (2007) und Konzept der U.S. EPA

Im Jahr 2007 wurde von einer Expertenkommission der U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) und des U. S. National Institute of Environmental Health Services (US NIEHS) am National Research Council (NRC) eine grundlegende Schrift herausgegeben: „Toxicity Testing in the 21st century, A vision and a strategy“ (NRC,

2007). Die Veröffentlichung wurde von zahlreichen ergänzenden und analysierenden Kommentaren begleitet und stellt ein zentrales Dokument in der derzeitigen regulatorischen Toxikologie dar. Als beteiligte Behörde hat die U.S. EPA einen eigenen Bericht veröffentlicht, der die Ideen der NRC-Publikation konkretisiert: „The U.S. Environmental Protection Agency’s Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals“ (EPA, 2009).

Ausgangspunkt der Überlegungen des NRC und der EPA ist eine Schwachstellenanalyse am derzeitigen Vorgehen der toxikologischen Risikobewertung. Die Einschränkungen, wie sie die Expertenrunde beim momentanen Vorgehen in der Prüfung der Toxizität von Chemikalien sieht, sind:

- die grundsätzliche Unsicherheit bei Verwendung tierexperimenteller Daten,
- die Extrapolation von einer Hochdosis (tierexperimentelle Studie mit kleinen Tierzahlen) auf eine niedrigere humanrelevante Dosis,
- erforderliche aufwändige Entwicklung immer weiterer zusätzlicher endpunktbezogener Tests, weil relevante Endpunkte im bisherigen Prüfsystem unzureichend abgedeckt waren und entsprechende Erfordernis zur Nachtestung von Substanzen,
- das ethische Problem des Tierschutzes,
- die Ausweitung des letztgenannten Problems angesichts der geforderten umfangreicheren Testung zusätzlicher toxikologischer Endpunkte für weitere Stoffe (zentrale Thematik bei REACH),
- die damit verbundenen extremen Kosten,
- die unzureichende Möglichkeit der Charakterisierung von Gemischen,
- unzureichende Zuordnung zu Risikogruppen oder Lebensphasen.

Auf diesem Hintergrund wird die derzeitige Teststrategie als Sackgasse gesehen und ein „grundlegend neues“ Konzept vorgeschlagen. Das neue Konzept des NRC stellt einen „bottom up“-Ansatz dar. Daten zu physikochemischen und biochemischen Parametern sollen ermittelt und genutzt werden, um die Toxizität eines Stoffes im Menschen festzustellen bzw. vorauszusagen, wobei damit in selteneren Fällen eine Absicherung über tierexperimentelle Studien notwendig ist und diese ggf. erforderlichen tierexperimentellen Studien gezielter eingesetzt werden können. Die Grundzüge dieses Ansatzes sind in Abschnitt 5.3.1 näher beschrieben.

Zur Verwirklichung eines solchen Konzepts ist es unabdingbar, dass zahlreiche stoffspezifische Daten, die uns Auskunft über die Interaktion von Stoffen mit dem Organismus geben, z.B. über *in vitro* Systeme erhoben werden. Hierfür stehen inzwischen moderne aufwändige Techniken bereit. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, sowie weiterer Organismen sind - aus der Biomedizin kommend - neue Möglichkeiten entstanden. So werden beispielsweise in der pharmazeutischen Industrie bereits seit längerem High throughput Screening (HTS-) Systeme angewandt, deren Grundlage die sogenannten „omics“-Technologien sind. Damit ist man in der Lage, eine ganze zu bezeichnende Molekülklasse, wie beispielsweise DNA bzw. RNA (Genomics), Proteine (Proteomics) oder Intermediärstoffwechselprodukte (Metabonomics) zu erfassen und substanzinduzierte Änderungen zu charakterisieren (Houck und Kavlock, 2008).

Entsprechend gehört zu dem neuen Konzept eine umfangreiche Datenbank, mit deren Hilfe die Informationen verfügbar gemacht und verknüpft werden können (vgl. Abschnitt 5.3.1).

Die folgende Tabelle 5-3 zeigt stichwortartig die erhofften Vorteile des Konzepts der EPA und der NRC-Kommission:

Tabelle 5-3: Vergleich traditionelle Toxizitätstestung mit Ansatz über Toxizitätspfade

	Traditionelle Toxizitätstestung	<i>In vitro/in vivo</i> – Ermittlung der Toxizitätspfade
Test	Zentral: Tierexperiment	Zentral: <i>in vitro</i> plus <i>in silico</i> - Ansätze plus begrenzte Tierstudien zur Absicherung von Mechanismen und Stoffwechsel
Biologische Grundlage	Tierbiologie	vorwiegend Humanbiologie
Betrachtete Dosis	Hohe Dosis	große Spanne von Dosen
Testdurchsatz	gering	groß
Kosten	hoch	reduziert
Anzahl von Tieren	hoch	deutlich geringer
Kritisches Ereignis	Beobachtete Endpunkte (außen sichtbar)	Störung der kritischen zellulären Reaktion (Toxizitätspfad)

### 5.3.1 Das Konzept

Bei dem Vorgehen nach NRC und EPA erfolgt ein „bottom up“- Ansatz. Es werden also Interaktionen von Chemikalien mit dem biologischen System auf den verschiedenen Aggregationsebenen gesucht, ausgehend von direkten molekularen Interaktionen der Chemikalie mit Rezeptoren oder Enzymen usw., weitergehend zu Informationen über die Regulierung entsprechender Wirkpfade (insbesondere anhand von Informationen aus den „genomics“, weitergehend zur Dokumentation der Reaktionen auf zellulärer Ebene bis schließlich hin zur Wirkung im Gewebe bzw. Zielorgan (vgl. Abbildung 5-4).

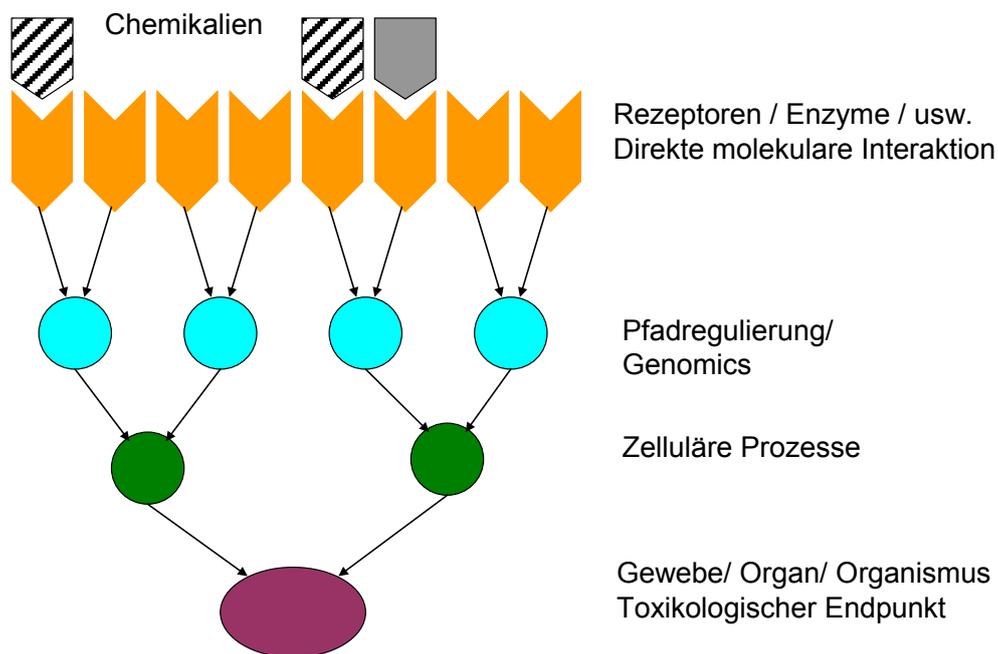


Abbildung 5-4: Toxizitätspfade zielen auf verschiedene Ebenen der biologischen Organisation (Abbildung in Anlehnung an: EPA, 2009)

Das Konzept beinhaltet zunächst die Charakterisierung der Substanzen anhand ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften einschließlich der Beurteilung der Persistenz in der Umwelt und der Fähigkeit zur Bioakkumulation, sowie der Menge in der sie produziert und in den Handel gebracht wird. Dazu sollen anhand von bereits vorhandenen Daten und computerbasierten Modellen Vorhersagen zu den Eigenschaften und der Toxizität getroffen werden. Dies schließt auch Aussagen über mögliche Metabolite und deren Eigenschaften mit ein. Im Übrigen werden in Abbildung 5-4 zwei Fälle schematisch charakterisiert (Chemikalie A - hier grau schattiert gezeichnet - wirkt nur über einen einzelnen Toxizitätspfad, Chemikalie B – hier schraffiert gezeichnet – wirkt über verschiedene Toxizitätspfade. Zwischen bei den Chemikalien kann es – im Beispiel bei der Pfadregulierung und dann später bei der Organtoxizität – zu einer Interaktion kommen).

Es geht darum, Toxizitätspfade für die einzelnen Substanzen zu beschreiben, das heißt, die Determinanten kennenzulernen und zu quantifizieren, die eine Störung der

gesunden Funktion beeinflussen (vgl. Abbildung 5-5). Die Reaktion richtet sich nach dem Ausmaß der Störung, dieses hängt wiederum mit der verabreichten Dosis, der Zeitspanne, der Adaptionsmöglichkeit und dem Zeitpunkt der Einwirkung und der Anfälligkeit des betroffenen Organismus zusammen.

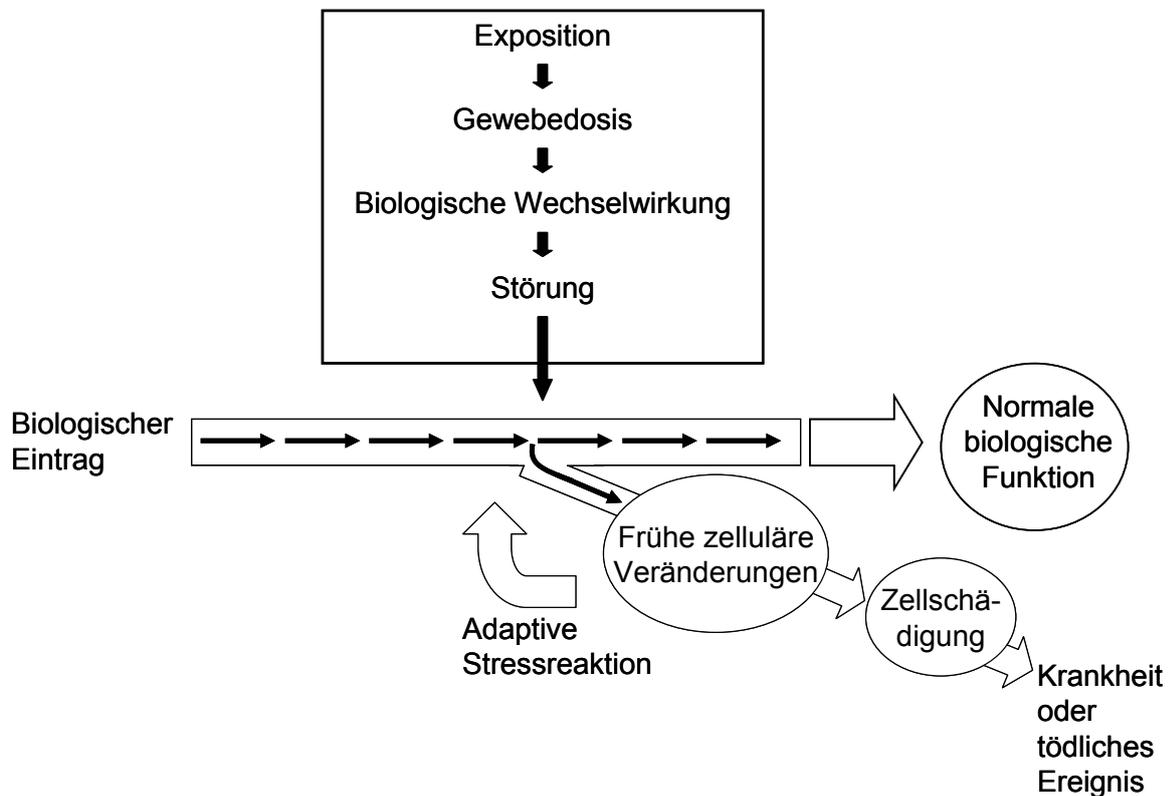


Abbildung 5-5: Biologische Reaktionen als Ergebnis eines Aufeinandertreffens der Exposition mit dem biologischen System. Bei dem Aufeinandertreten kann es zu einer Störung des biologischen Pfades kommen. Wenn diese Störung deutlich genug ausgeprägt ist oder wenn keine Adaptionsmöglichkeiten bestehen (z.B. wegen Ernährungslage, genetischen Bedingungen, Krankheit, Lebensstadium etc.), dann ist die biologische Funktion beeinträchtigt, was zu Toxizität und Krankheit führt (Abbildung in Anlehnung an NRC, 2007)

Im Konzept der EPA und des NRC sollen zusätzlich gezielte Untersuchungen an Tieren möglich sein, z.B. um einen vermuteten Mechanismus substanzspezifisch zu validieren oder um einen vermuteten Effekt zu überprüfen.

Um diese Vorstellung in die Tat umzusetzen, sind in den nächsten Jahrzehnten verschiedene Forschungsaktivitäten erforderlich:

- Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden
- Identifizierung zentraler Toxizitätspfade
- Entwicklung von pharmakokinetischen Modellen, Dosis-Wirkungs- bzw. Extrapolationsmodellen

Der dazu vom NRC ausgearbeitete Ansatz umfasst die in Abbildung 5-6 gezeigten Bereiche.

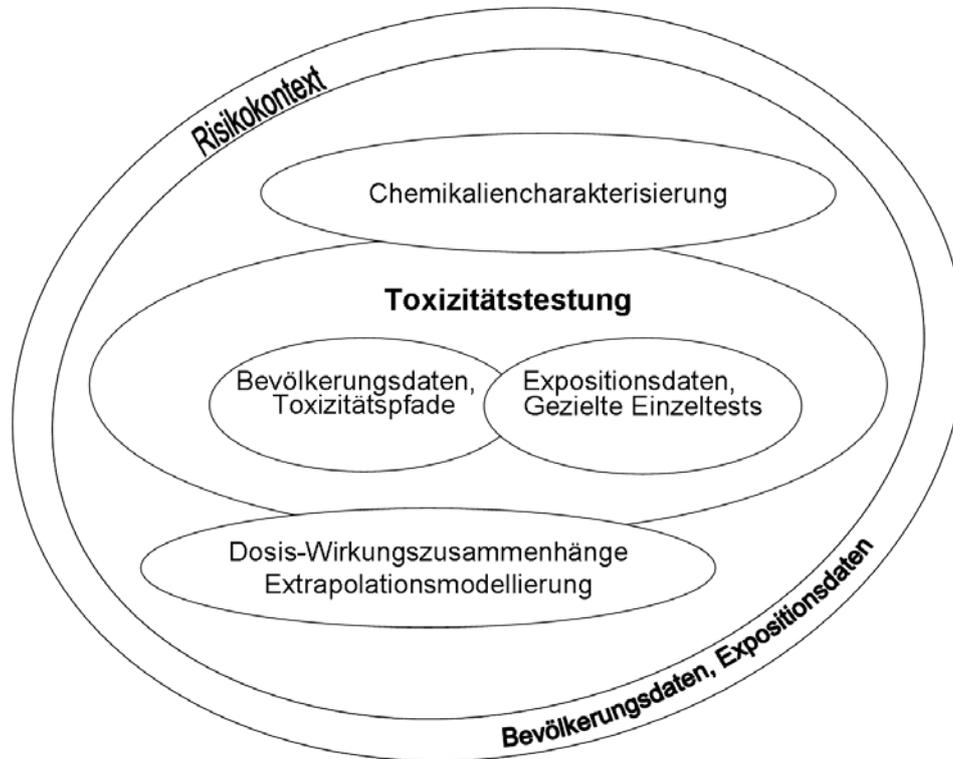


Abbildung 5-6: Schematische Darstellung der optimalen Vorgehensweise zur Prüfung und Bewertung des Gefahrenpotentials von Chemikalien so wie es das NRC in Zukunft vorsieht (NRC, 2007)

- Um Modellierungen durchführen zu können,
- um aus Modellierungen zu anderen Substanzen zu lernen,
- um ebenso aus bestehenden Daten zu klassischen Wirkungen und damit vermutlich verbundenen Mechanismen und Korrelationen zu chemischen Strukturen etc. zu lernen,
- um Ergebnisse z.B. aus den Genomics interpretieren zu können,
- usw.,

ist es notwendig, eine sehr umfangreiche Datenbasis aufzubauen und bestehende Informationssysteme sinnvoll zu verknüpfen. Nur bei Nutzung aller dieser technischen Möglichkeiten besteht die Aussicht für eine tatsächliche Ablösung derzeit angewandter Teststrategien durch das avisierte System.

Zu diesem Zweck hat die EPA das Informationsnetzwerk ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource) geschaffen (Judson et al., 2009; Richard, 2006). Abbildung 5-7 symbolisiert die Elemente von ACToR und deren Integration für eine zukünftige Chemikalienbewertungsstrategie.

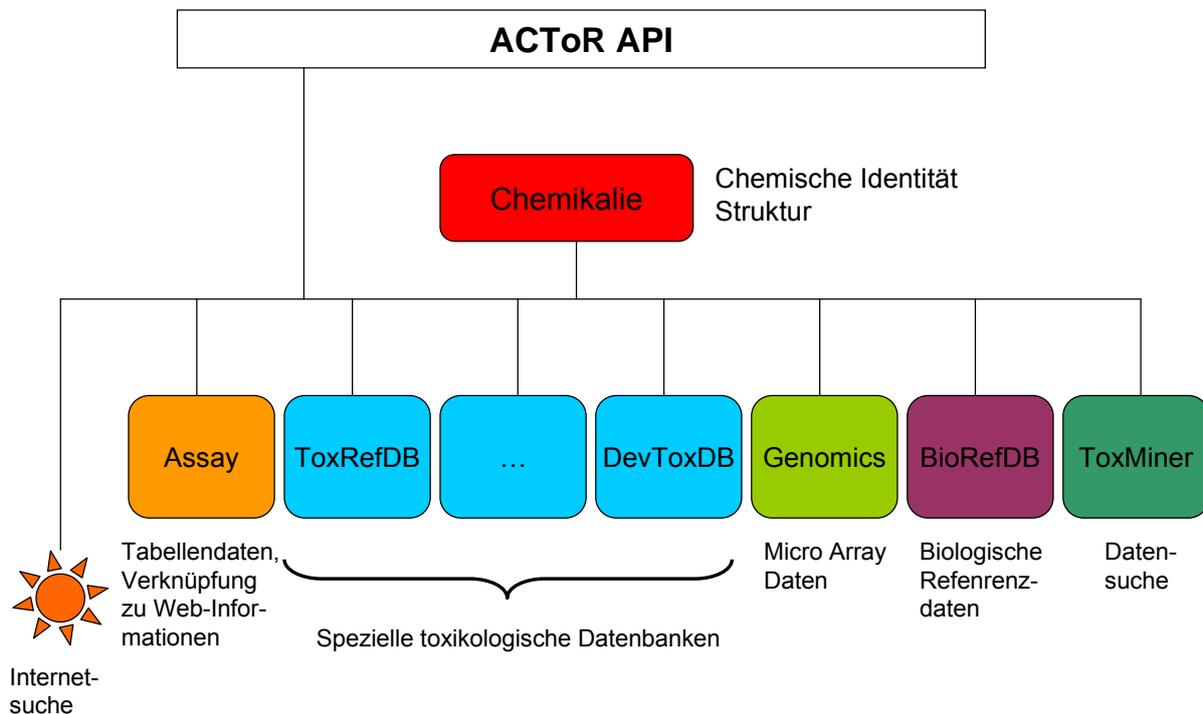


Abbildung 5-7: Entwicklung einer Wissensbank: ACToR führt verschiedene, derzeit isoliert bestehende Informationsquellen zusammen und bietet eine benutzerfreundliche Oberfläche, um einfach Toxizitätsdaten zu ermitteln und zu analysieren (Abbildung in Anlehnung an EPA, 2009).

In Verbindung mit ACToR ist das prädiktive Programm ToxCast<sup>TM</sup> der EPA zu sehen (Agusto, 2009): In einer ersten Stufe dieses Programms, wurde bereits für über 300 Chemikalien, deren toxikologisches Verhalten aus *in vivo* Untersuchungen bekannt ist, ein toxikologisches Profil erstellt und in dieser Datenbank hinterlegt (Validierungssatz). Für diese Substanzen wurde auch mit Hilfe von *in vitro* und *in silico* Methoden die Toxizität abgeschätzt. Assays, wie sie derzeit in ToxCast berücksichtigt werden, nennt Tabelle 5-4.

Ausgehend von diesen Aktivitätsprofilen wurde versucht, ein Muster für die Vorhersage von Toxizität im *in vivo* Versuch zu generieren. In der zweiten Phase soll die Vorhersagekraft noch gesteigert werden und eine vielfältigere Auswahl an Chemikalien getestet werden. In der dritten und gleichzeitig wichtigsten Phase soll nun das Wissen, welches in Phase eins und zwei angesammelt wurde, dazu benutzt werden, um Prioritäten für die zur Prüfung ausstehenden Chemikalien zu setzen. (Dix et al., 2007; Judson et al., 2008; Kavlock et al., 2009; Kavlock et al., 2008; EPA, 2009).

Recherchen in ToxCast wie in ACToR benötigen eine harmonisierte Sprache und konventionalisierte Eingabe der chemischen Struktur. Hierfür wird das System über das DSSTox Projekt geliefert (Distributed Structure Searchable Database network; <http://www.epa.gov/ncc/dsstox/>).

Tabelle 5-4: ToxCast *in vitro* HTS-Assays („high throughput“) (Richard, 2009)

<b>Biochemical Assays</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein Families</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- GPCR</li> <li>- NR</li> <li>- Kinase</li> <li>- Phosphatase</li> <li>- Protease</li> <li>- Other Enzymes</li> <li>- Ion Channel</li> <li>- Transporter</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assay formats</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- radioligand binding</li> <li>- enzyme activity</li> <li>- co-activator recruitment</li> </ul>
<b>Cellular Assays</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cell lines</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- HepG2 human hepatoblastoma</li> <li>- A549 human lungcarcinoma</li> <li>- HEK 293 human embryonic kidney</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primary cells</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Human endothelial cells</li> <li>- Human monocytes</li> <li>- Human keratinocytes</li> <li>- Human fibroblasts</li> <li>- Human proximal tubule kidney cells</li> <li>- Human small airway epithelial cells</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biotransformation competent cells</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primary rat hepatocytes</li> <li>- Primary human hepatocytes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assay formats</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cytotoxicity</li> <li>- Reporter gene</li> <li>- Gene expression</li> <li>- Biomarker production</li> <li>- High-content imaging for cellular phenotype</li> </ul>

Die Auswertung zu 309 Chemikalien (hauptsächlich Pestizide) liegt inzwischen vor (Judson et al., 2010). 467 Assays mit 9 verschiedenen Technologien wurden durchgeführt, einschließlich von HTS zellfreien Assays und zellenbasierten Assays, sowohl in menschlichen Primärzellen und Zelllinien, wie auch in primären Rattenhepatozyten. Es zeigte sich unter anderem:

- Die Aussagekraft der HTS-Assays wurde als vertrauenswürdig eingestuft, da erwartete Effekte sich meist bestätigten (z.B. Bisphenol A als Estrogenrezeptor-Agonist in Konzentrationen unter 1 µM in drei verschiedenen Assays). Erwartete Peroxisomenproliferationsaktivität wurde ebenfalls bestätigt, z.B. bei PFOA und PFOS, DEHP, und Lactofen.
- In einigen Fällen wurden jedoch im Testassay auch unerwartete biologische Pfade aktiviert, so dass zusätzliche Wirkungsmechanismen nahe gelegt werden. So zeigte PFOS gegenüber einigen Metalloproteinasen eine Aktivität in niedrigen Konzentrationen: dies kann Grundlage für genauere Untersuchungen werden.
- Nur bei 0,5% der Chemikalien-Assay-Paare (n=828) lag die halbmaximale Aktivitätskonzentration oder die niedrigste effektive Effektkonzentration bei weniger als 1 µM.
- Die Substanzgruppen mit Hinweis auf niedrigste Effektkonzentrationen waren Phenoxyverbindungen und Sulfonylharnstoffverbindungen sowie Trizinylsulfonylharnstoffverbindungen, während z.B. Conazole, Triazole, Pyrethroide und Organothiophosphate erst bei höheren Konzentrationen aktiv waren.
- In einigen Fällen waren diese Effektkonzentrationen zugleich mit Zytotoxizität in zellbasierten Assays verknüpft (z.B. Apoptose, Nekrose), in anderen zeigte sich keine begleitende Zytotoxizität. Hier ergeben sich gute Differenzierungsmöglichkeiten.
- Eine gleichzeitige Störung in mehreren in vitro-Systemen in niedrigen Konzentrationen (Gesamtbetrachtung) korrelierte sehr gut mit der niedrigen in vivo-Toxizitätskonzentrationen.

### 5.3.2 Diskussion

Wie in den vorangegangenen Kapiteln deutlich wurde, ist die Zuordnung eines biochemischen Vorgangs zu einem adversen Effekt auf Ebene des Gesamtorganismus ein kritischer und sehr zeitaufwendiger Schritt. Es benötigt das Wissen vieler, um die chemikalien-induzierte Störung eines zellulären Mechanismus, einem bestimmten adversen Effekt im menschlichen Organismus zuzuordnen. Es wird viel Zeit, interdisziplinäre Spitzenforschung und Kommunikation benötigt, die genannten Toxizitätspfade zu identifizieren, genau abzubilden und für behördliche Zwecke zu validieren.

Aussagen über das Ausmaß der Störung, welches genügt um den oben beschriebenen adversen Effekt zu einer bestimmten Zeit auszulösen, sind sehr schwer zu treffen (Quantifizierungsprobleme). Hierbei wird von der EPA auch das Instrument des „pharmakokinetik modelling“ eingesetzt.

Insgesamt erntete der vorgelegte Bericht des NRC nicht nur Lob, er gab in Fachkreisen auch Anlass zur Diskussion. Diverse Kritik und Meinungsäußerungen zur

Umsetzung und Machbarkeit der dargestellten Ausarbeitungen sind veröffentlicht (vgl. z.B. Andersen und Krewski, 2009; Meek und Doull, 2009, Hartung, 2009).

Erster Kritikpunkt dabei ist, dass sehr komplexe Systeme, wie z.B. Auswirkungen des zentralen Nervensystems, nicht in solchen Toxizitätspfaden abgebildet werden können. Die *in vitro* beobachteten Veränderungen in Zellen dieses Systems sind vom Ort, an dem der pathophysiologische Effekt letztlich auftritt, über zu viele andere Wege verknüpft, der adverse Effekt ist „zu weit entfernt“. Außerdem greift der Bericht nach Meinung von Kritikern viel zu weit in die Zukunft. Es fehlen effiziente und pragmatische Ansätze auf regulatorischer Ebene, die die Übergangszeit hin zu den geforderten einschneidenden Veränderungen, die mehrere Jahrzehnte Zeit in Anspruch nehmen werden, sinnvoll überbrücken. Aus Sicht der Kritiker werden die Betroffenen (Industrie und Wissenschaft) bezüglich der jetzigen Probleme allein gelassen. (Meek und Doull, 2009).

Der NRC-Bericht nennt sich jedoch „eine Vision“ und bietet ein langfristig umzusetzendes und zu konkretisierendes Konzept, so dass der Anspruch einer pragmatischen kurzfristigen Hilfestellung einfach nicht mit den Zielen dieses Berichts übereinstimmt. Natürlich können zusätzlich Zwischenschritte ergänzt werden und dies ist auch dringend erforderlich, wie dies z.B. durch die Ausführungen der EPA bereits aktuell erfolgt. Dies spricht jedoch nicht gegen die Vision als Leitgedanke.

Die NRC-Vision betont mehrfach den Neuigkeitscharakter dieses Konzepts. Die konsequente methodische Nutzung neueren Wissens ist in einem integrierten Ansatz tatsächlich etwas grundlegend Neues. Die einzelnen Elemente aber, z.B. die Ergründung der Toxizität über mechanistische Studien, die Nutzung von Genomics, die Einbeziehung von QSAR-Elementen etc. ist im Prinzip ein seit längerer Zeit zunehmend verfolgter Ansatz, der im Einzelfall bereits in den letzten 10 Jahren vermehrt Anwendung fand. Tabelle 5-5 zeigt die Anzahl der Treffer in den jeweiligen Jahrgängen unter den angegebenen Stichworten in den Datenbanken PubMed und ToxLine. Damit wird deutlich, dass zunehmend, jedoch bereits seit geraumer Zeit, die hier diskutierten Instrumente Verwendung finden.

Tabelle 5-5: Anzahl der Treffer unter den angegebenen Stichworten in den Datenbanken PubMed und ToxLine in verschiedenen Jahren – Hinweise auf die Zunahme des „bottom up“-Denkens, der sich jedoch auch ohne integrierendes Konzept bereits seit längerer Zeit in Forschung und wissenschaftlichen Publikationen wieder findet

Jahr	Datenbank	Genomics	Metabonomics	High Throughput screening	Computational Toxicology	Molecular Toxicology	Predictive Toxicology
1995	PubMed	829	0	9	0	42	1
	ToxLine	791	0	2	0	94	4
2003	PubMed	3514	54	350	4	163	17
	ToxLine	1385	19	97	3	156	19
2004	PubMed	4694	99	390	2	193	5
	ToxLine	1393	32	80	14	195	14
2005	PubMed	5973	172	497	9	217	12
	ToxLine	1486	52	128	12	189	16
2006	PubMed	6696	213	558	12	211	11
	ToxLine	1532	44	118	12	177	17
2007	PubMed	7076	314	625	14	220	11
	ToxLine	1418	36	104	18	147	12
2008	PubMed	7752	455	676	26	210	12
	ToxLine	1562	27	126	18	148	10

## 6 Schlussfolgerungen

Die Ausführungen haben gezeigt, dass das Umweltbundesamt mit diesem Projekt zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine hochaktuelle Thematik in der Konzeption toxikologischer Testungen und in deren Einbettung in die regulatorische Toxikologie aufgreift. Die Anforderung in dem Projekt lautete, mechanistisches Verständnis auf der biochemischen und zellulären Ebene nutzbar zu machen, um a) in der Einzelstoffbewertung zusätzliche Erkenntnisse zu „neuen“ Endpunkten zu gewinnen, und um b) zusätzliche Erkenntnisse zur Wirkung von Stoffgemischen zu generieren. Es war dem Umweltbundesamt zugleich bewusst, dass eine reine Literaturarbeit keine abschließenden Aussagen würde treffen können und dass in einem Folgeschritt Verdachtsmomente, die auf Basis von mechanistischen Überlegungen sich ergeben, über experimentelle Studien zu erhärten wären. Für solche praktischen Testmöglichkeiten sollten Ansätze benannt werden.

Nur wenig früher hatten in den USA ähnliche Diskussionen begonnen, die erst in jüngster Zeit zu ersten (vorläufigen) Ergebnissen führen. Mit dem Konzept der „Toxikologie des 21. Jahrhunderts, eine Vision und eine Strategie“ wird eben diese Thematik in den USA derzeit intensiv verfolgt. Für einen ersten Testsatz von ca. 320 Substanzen wurden Erkenntnisse zum Mechanismus, Daten zu physikalisch-chemischen Eigenschaften und klassische Toxizitätsdaten zusammengefasst und mit neuen Erkenntnissen zur Gen- und Proteinexpression aus High Throughput- *in vitro*-Methoden verknüpft, um mechanistische Erkenntnisse für eine Substanzbewertung und Prioritätsbildung nutzbar zu machen (Judson et al., 2010; vgl. auch Abschnitt 5.3.1).

Allerdings wird mit dem Hinweis der amerikanischen Behörden auf den Visionscharakter auch deutlich, dass wir uns mit einer toxikologischen Betrachtungsweise, die von (mechanistisch begründeten) Toxizitätspfaden ausgeht, noch am Anfang befinden und zunächst eine Strategie entwickeln müssen, um diese Vision zur Wirklichkeit werden zu lassen. Dafür wurde in den USA eine „roadmap“ entwickelt. Außerdem bezieht der Ansatz in den USA neue Endpunkte zwar ein und benennt auch die Möglichkeit, über diesen Weg bessere Aussagen zur Toxizität von Gemischen gewinnen zu können - der Fokus in den USA ist jedoch zunächst etwas beschränkter, nämlich zunächst

- zu weit mehr bisher ungetesteten Chemikalien Grundausagen zu zentralen, üblichen Wirkungen zu generieren,
- damit Tierversuche einzusparen,
- damit Zeit einzusparen, die sonst für die langen subchronischen und chronischen Tests erforderlich wäre, und die somit bei konventioneller toxikologischer *in vivo*-Testung sich untragbar lange ausdehnen würde,
- damit auch Geld einzusparen, und
- zugleich rationale, gezielte Prioritätssetzungen für die Erhärtung von Screeningbefunden zu ermöglichen.

Durch den Blick auf neue Endpunkte und Gemische wird demnach beim Umweltbundesamt ein Teilaspekt dieses Paradigmenwechsels in der regulatorischen Toxikolo-

gie aufgegriffen, der besonders ambitioniert ist und im besonderen Maße noch Visionencharakter besitzt. Mit dem vorliegenden Bericht wird demnach ein bedeutender Bereich der regulatorischen Toxikologie betreten, der bisher noch weitgehend brach lag. Es wird aber auch deutlich, dass noch zentrale Unsicherheiten in der Benennung entsprechend biochemisch und mechanistisch begründeter Toxizitätspfade bestehen, die eine umgehende Umsetzung im größeren Maßstab einschließlich der erforderlichen nachfolgenden Testung bisher kaum ermöglichen. Die Komplexität, die mechanistische Unsicherheit und die begrenzte Datenlage zu den „neuen“ Endpunkten (wie Alzheimer Erkrankung, spezifischer immuntoxischer Mechanismen oder des Alterns) verhindern noch, dass Hypothesen mit genügender Sicherheit aufgestellt und umfassend validiert werden können. Anhand der Betrachtungen zu Gemischen wurde gezeigt, dass auch in diesem Bereich bei vielen konkurrierenden und miteinander verzahnten mechanistischen Schritten es derzeit noch schwer ist, den für die resultierende Gesamtwirkung maßgeblichen Toxizitätspfad zu erkennen und (zumindest halb-) quantitative Schlussfolgerungen zu ziehen.

Dennoch erscheint es uns unabdingbar, die hier angestellten Betrachtungen fortzuführen und auch die Wirkung von Chemikalien in Richtung auf bisher wenig betrachtete „neue“ Endpunkte zu lenken sowie Methoden zu entwickeln, die bei heterogenen Gemischen mit komplexer Stoffzusammensetzung qualifizierte Antworten zur Schadwirkung ermöglichen. Der Ansatz über Toxizitätspfade scheint hier alternativlos, will man nicht zurückfallen entweder auf a) die (im Vorsorgebereich kaum vertretbare) Nichtberücksichtigung von Kombinationswirkungen, oder b) die standardmäßige Unterstellung einer additiven Stoffwirkung, wie dies bisweilen eher aus Hilflosigkeit in der regulatorischen Toxikologie erfolgt, oder c) den pauschalen Rückzug auf das Konzept des „threshold of toxicological concern“ (auch für Gemische), der wiederum auf Statistik zurückgreift und eingestandenermaßen auf tiefere spezifische toxikologische Analysen verzichtet.

In dieser Hinsicht bietet der vorliegende Bericht erste Ansätze für die Berücksichtigung der Wirkung von Chemikalien in Bezug auf neue Endpunkte und als Teil von Gemischen, die jedoch noch an ein wissenschaftsgestütztes „trial and error“ Vorgehen unter Einschluss einiger biochemischer und mechanistischer Überlegungen erinnern. Die Beispiele sollen eine Annäherung an ein neues Denken erläutern und dürfen noch keinesfalls als Element einer neuen Strategie missverstanden werden. In diesem Sinne würden wir es begrüßen, wenn

- die oben genannten Furanverbindungen näher untersucht würden, in ihrem Metabolismus (Bildung von 2-Alkenalen), in ihrer Möglichkeit, die Zielzellen zu erreichen (Überwindung der Blut-Hirnschranke), und in ihrer Fähigkeit, als Substituent von Stickstoffmonoxiden Neurotransmittertransport stören (vgl. Abschnitt 2.1.6),
- die oben genannten Verbindungen (Fibronil, Neonicotinoide) näher untersucht würden, ob sie den Glycocorticoid-Rezeptor erreichen, zu einer entsprechenden Interaktion mit dem Rezeptor führen und ob sie in der Lipid-Wasser-Grenzschicht akkumulieren (vgl. Abschnitte 2.2.8, 2.2.10),
- die oben genannten Verbindungen bzw. Stoffgruppen (Phthalate, Nonylphenol und Methoxychlor) näher auf ihre neurotoxische Wirkung und den dafür maßgeblichen Mechanismus untersucht würden, wobei zunächst die Datengrundlage (Zitate nach der Comparative Toxicogenomic Database CTD) im Ori-

ginal zu analysieren und auf ihre Aussagekraft hin zu bewerten wären (vgl. Abschnitt 2.3.8).

Auch wenn sich einige der aufgestellten Hypothesen zur Wirkungsähnlichkeit der betrachteten Substanzen – wie zu erwarten – nicht bestätigen werden, sind die Beispiele hilfreich, um wirkungsorientierte Ansätze entsprechend zu erweitern und um ggf. erforderliche weitere Nebenbedingungen angemessener einbeziehen zu können.

Zu Gemischen mit einer geringeren Anzahl von interagierenden Stoffen wäre es hilfreich, mit Hilfe der CTD gemeinsam betroffene Endpunkte und/oder gemeinsam betroffene Veränderungen in der Gen- oder Proteinexpression zu erfassen und für das konkrete Gemisch solche postulierten Veränderungen in der Gen- oder Proteinexpression experimentell zu überprüfen und Wirkungstests auf begründet vermutete, besonders bedeutende Wirkungsendpunkte durchzuführen (vgl. Abschnitt 5.2). Hier könnte auch ein negatives Ergebnis ein erster Schritt sein, um differenziertere Aussagen zu Kombinationswirkungen bei gegebener Einzelstoffcharakteristik zu gewinnen.

Wie jedoch ebenfalls erläutert, ergeben die vorangeschritteneren Ansätze aus dem amerikanischen Raum bereits weitergehende Möglichkeiten zur Berücksichtigung in der regulatorischen Toxikologie, die nach unserer Einschätzung dringend gefördert und in Teilen bereits umgesetzt werden sollten.

Hier sind folgende Vorschläge zur Umsetzung zu machen:

- Sofern Risikoabschätzungen zu Einzelstoffen vom Umweltbundesamt veranlasst werden, könnte vom Auftragnehmer grundsätzlich gefordert werden, dass Erkenntnisse zu Wirkungsmechanismen als Element des Stoffberichts vermehrt dokumentiert und berücksichtigt werden. Zwar enthalten auch derzeitige Risk Assessment-Monographien oft eine Passage, in der der „Mode of Action“ benannt für den als zentral erachteten Effekt wird, auf die Informationen, wie sie zum Beispiel in „-Omics“-Analysen generiert werden und wie sie zum Beispiel in der CTD hinterlegt sind, wird dabei jedoch in der Regel verzichtet. Diese Überlegung kann auch bei Endpunkten, die zunächst nicht als kritisch bewertet werden, von Interesse sein, ganz im Sinne der im vorliegenden Bericht thematisierten „neuen“ Endpunkte. Auch im Rahmen von REACH (Chemical Safety Assessment) werden entsprechende biochemische und mechanistische Informationen nur unzureichend berücksichtigt. Es ist zwar sicherlich nicht erforderlich, jedes Datum zu einer Genexpression zu verfolgen und deren Bedeutung zu dokumentieren und einzuschätzen, aber es könnten so durchaus gewichtige Hinweise ermittelt werden, die einen Verdacht, z.B. aus einer unzureichenden epidemiologischen Studie oder einem veralteten Tierexperiment, erhärten oder entkräften und so zu einer verbesserten „weight of evidence“-Bewertung führen.
- In diesem Sinne sollten bei Stoffbewertungen bei Endpunkten, wo die derzeitige Datenlage keine abschließende Bewertung erlaubt, auch Überlegungen aus kristallographischen Methoden in Verbindung mit Toxizitätspfaden in READ-ACROSS-Abschätzungen eingehen, selbst wenn der zeitige (Q)SAR-Modelle den betreffenden Endpunkt noch nicht abdecken. Eine Arbeit von Edelstein et al. (2010) zeigt eindrücklich an mehreren Stoffbeispielen, wie die Prädiktivität von QSAR-Modellen durch Verwendung von entsprechenden Informationen signifikant verbessert werden können. Diese Beispiele demonstrieren auch,

dass es bereits jetzt möglich ist, die umfassenden Datenbanken nutzbar zu machen, die im Rahmen der US-Initiative derzeit etabliert werden (vgl. Abschnitt 5.3.1). Die Auswertung von Edelstein et al. (2010) stellt eine aktuelle Arbeit der Technischen Universität, München (Institut für Informatik) dar.

- Für endpunktbezogene Forschung stehen zum Teil bereits geeignete High-Throughput-Screening Methoden zur Verfügung, die genutzt werden sollten, um auf dieser Basis gezielt prioritäre Einzelstoffe für spezifischere Testungen zu generieren und um Daten einzupflegen, die anderen Nutzern im internationalen Raum eine verbesserte Datenbasis bieten. So gibt es für den Endpunkt der Entwicklungsneurotoxizität entscheidende Fortschritte (Bal-Price et al., 2010; Breier et al., 2010), die Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Auch diese Projekte laufen unter wesentlicher deutscher Beteiligung.
- Ein umfassender Überblick über die konkrete Eignung und Validierung der vorliegenden High-Throughput-Methoden oder anderer biochemisch-mechanistischen Ansätze zur Erkennung von Toxizitätspfaden (z.B. auch der *in vitro*-Methoden nach ECVAM) sowie der entsprechenden Datenbanken liegt bisher nicht vor und wurde auch im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht generiert. Eine wichtige Basis zur verbesserten Nutzung dieses Instrumentariums wäre also eine qualifizierte Dokumentation wünschenswert, die unter anderem wirkungsendpunktbezogene Analysen ermöglicht (wie zum oben genannten Beispiel der Entwicklungsneurotoxizität). Eine solche Dokumentation sollte laufend aktualisiert und ergänzt werden können.
- Mit dem umfangreicheren Wissen um Toxizitätspfade ergibt sich eine Problematik für die bisherige Methodik einer Risiko- und Grenzwertabschätzung von chemischen Stoffen und Gemischen. Ein zentraler Eckpunkt derzeitiger Bewertungen ist der „No adverse effect level“ (NOAEL) oder die entsprechende Effektkonzentration (LOAEL). Es wäre nach unserer Einschätzung eine wichtige Aufgabe regulatorischer Planung, in Anbetracht von biochemischen oder zellulären Veränderungen und Störungen weit unterhalb des von außen beobachtbaren adversen Effekts eine neue Taxonomie des Adversitätsbegriffs zu initiieren (Boekelheide und Campion, 2010).

## 7 Literatur

### 7.1 Literatur zu Abschnitt 0

Edwards, S.W.; Preston, R.J., 2008  
Systems biology and mode of action based risk assessment  
Toxicological Sciences, **106**, 2008, 312-318

### 7.2 Literatur zu Abschnitt 1

- Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F. B.; Starke, K., 2009  
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel  
10. Aufl., Urban & Fischer Bei Elsevier, 2009
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D., 1983  
Molecular Biology of the Cell  
Garland Publishing, Inc., New York & London, 1983
- Aldridge, W.A., 1958  
The biochemistry of organotin compounds. Trialkyltins and oxidative phosphorylation  
Biochemical Journal, **69**, 1958, 367-376
- Ambudkar, S.V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z.E.; Gottesman, M.M., 2003  
P-glycoprotein: from genomics to mechanism  
Oncogene, **22**, 2003, 7468-7485
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995  
Toxicological Profile for Dinitrophenols  
U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service, 1995
- Bain, L.J.; McLachlan, J.B.; LeBlanc, G.A., 1997  
Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein  
Environmental Health Perspectives, **105**, 1997, 812-818
- Balasubramanian, S.V.; Straubinger, R.M.; Morris, M.E., 1997  
Salicylic acid induces changes in the physical properties of model and native kidney membranes  
Journal of Pharmaceutical Sciences, **86**, 1997, 199-204
- Bamforth, K.J.; Jones, A.L.; Roberts, R.C.; Coughtrie, M.W., 1993  
Common food additives are potent inhibitors of human liver 17 alpha-ethinyloestradiol and dopamine sulphotransferases  
Biochemical Pharmacology, **46**, 1993, 1713-1720
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., 2007  
Stryer Biochemie  
6. Aufl., Spektrum, München, Heidelberg, 2007
- Bizhanova, A.; Kopp, P., 2009  
Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid  
Endocrinology, **150**, 2009, 1084-1090
- Boelsterli, U.A., 2007  
Mechanistic Toxicology. The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets  
CRC Press, London, New York, 2007
- Coughtrie, M.W.; Johnston, L.E., 2001  
Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance  
Drug Metabolism and Disposition, **29**, 2001, 522-528
- Coughtrie, M.W.H.; Sharp, S.; Maxwell, K.; Innes, N.P., 1998  
Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases  
Chemico-Biological Interactions, **109**, 1998, 3-27

- Cuevas, B.D.; Abell, A.N.; Johnson, G.L., 2007  
Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration  
*Oncogene*, **26**, 2007, 3159-3171
- Derelanko, M.J.; Hollinger, M.A., 2002  
Handbook of Toxicology  
CRC Press, London, New York, 2. Auflage, 2002
- Eanes, R.Z.; Kun, E., 1974  
Inhibition of Liver Aconitase Isozymes by (-)-erythro-Fluorocitrate  
*Molecular Pharmacology*, **10**, 1974, 130-139
- Eaton, E.A.; Walle, U.K.; Lewis, A.J.; Hudson, T.; Wilson, A.A.; Walle, T., 1996  
Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention  
*Drug Metabolism and Disposition*, **24**, 1996, 232-237
- EPA, U.S. Environmental Protection Agency, 1999  
Recognition and Management of Pesticide Poisonings, ed. Dr. J. Routt Reigart and Dr. James R. Roberts, 5th edition  
online: <http://www.epa.gov/opp00001/safety/healthcare/handbook/handbook.htm>, Druckdatum 16.04.2009
- Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A.; Petering, H.G., 1975  
Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinatase  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **65**, 1975, 303-311
- Forge, A.; Becker, D.; Casalotti, S.; Edwards, J.; Evans, W.H.; Lench, N.; Souter, M., 2008  
Gap junctions and connexin expression in the inner ear  
Novartis Foundation Symposium, **219**, 1999, 134-150
- Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W., 1987  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 5. Auflage, 1987
- Foth H., 1995  
Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds--implications for chemically induced toxicity  
*Critical Reviews in Toxicology*, **25**, 1995, 165-205
- Fujita, H.; Nishitani, C.; Ogawa, K., 2002  
Lead, Chemical Porphyria, and Heme as a Biological Mediator  
*Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **196**, 2002, 53-64
- Gautam, A.K.; Chowdhury, A.R., 1987  
Effect of lead on erythropoietic system of intact and splenectomized rats  
*Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, **31**, 1987, 117-124
- Ghazali, R.A.; Waring, R.H., 1999  
The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention  
*Life Sciences*, **65**, 1999, 1625-1632
- Gibbs, P.N.; Gore, M.G.; Jordan, P.M., 1985  
Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinatase  
*Biochemical Journal*, **225**, 1985, 573-580
- Glatt, H., 2000  
Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics  
*Chemico-Biological Interactions*, **129**, 2000, 141-170
- Gumy, C.; Chandsawangbhuwana, C.; Dzyakanchuk, A.A.; Kratschmar, D.V.; Baker, M.E.; Odermat, A., 2008  
Dibutyltin Disrupts Glucocorticoid Receptor Function and Impairs Glucocorticoid-Induced Suppression of Cytokine Production  
*Plos ONE*, **3**, 2008, e3545, online:  
<http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003545>, Druckdatum: 16.04.2009

- Haeger-Aronsen, B.; Schütz, A., 1976  
Antagonistic effect in vivo of zinc on inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead  
*Archives of Environmental Health*, **31**, 1976, 215-220
- Hanafy, K.A.; Krumenacker, J.S.; Murad, F., 2001  
NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction  
*Medical Science Monitor*, **7**, 2001, 801-819
- Hill, S.M., 1998  
Receptor crosstalk: communication through cell signaling pathways  
*The Anatomical Record*, **25**, 1998, 42-48
- Hoet, P.H.; Nemery, B., 2000  
Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions  
*American Journal of Physiology - Lung Cell Molecular Physiology*, **278**, 2000, L417-L433
- Horn, F.; Moc, I.; Schneider, N.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Lindenmeier, G., 2005  
*Biochemie des Menschen*  
3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005
- Jones, P.M.; George, A.M., 2004  
The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research  
*Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 2004, 682-699
- Josephy, P. D.; Mannervik, B., 2006  
*Molecular Toxicology*  
New York, Academic Press, 2006
- Kanematsu, M.; Takagi, K.; Suketa, Y., 1996  
Lead inhibits nitric oxide production transiently by mRNA level in murine macrophage cell lines  
*Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **19**, 1996, 949-951
- Klaassen, C. D., 1995  
*Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*  
McGraw-Hill, 1995
- Knight, J.A., 2000  
Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system  
*Annals of Clinical and Laboratory Science*, **30**, 2000, 145-158
- Kurelec, B., 1997  
A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance  
*Environmental Health Perspectives*, **105**, 1997, 855-860
- Lefebvre, P.P.; Van De Water, T.R., 2000  
Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene  
*Brain Research – Brain Research Reviews*, **32**, 2000, 159-162
- Leibson, T.; Lifshitz, M., 2008  
Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in Southern Israel  
*The Israel Medical Association Journal*, **10**, 2008, 767-770
- Litman, T.; Druley, T.E.; Stein, W.D.; Bates, S.E., 2001  
From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance  
*Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 2001, 931-959
- Löffler, G.; Petrides, P.E.; Heinrich, P.C., 2007  
*Biochemie und Pathobiochemie*  
Springer Verlag, Heidelberg, 2007
- Loomis, W.F.; Lipmann, F., 1948  
Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation  
*The Journal of Biological Chemistry*, **173**, 1948, 807-808
- Luckenbach, T.; Epel, D., 2005  
Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters  
*Environmental Health Perspectives*, **113**, 2005, 17-24

- Luckenbach, T.; Corsib, I.; Epela, D., 2004  
Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mus-  
sels  
Marine Environmental Research, **58**, 2004, 215-219
- Moon, Y J, Wang, X, Morris, M E, 2006  
Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism  
Toxicology In Vitro, **20**, 2006, 187-210
- Nickel, R.; Forge, A., 2008  
Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness  
Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, **16**, 452-457
- NRC, National Research Council, 2007  
Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy  
The National Academies Press, Washington, DC  
[www.nap.edu/catalog/11970.html](http://www.nap.edu/catalog/11970.html), 2007
- Oswald, S.; Grube, M.; Siegmund, W.; Kroemer, H.K., 2007  
Transporter-mediated uptake into cellular compartments  
Xenobiotica, **37**, 2007, 1171-1195
- Proudfoot, A.T.; Bradberry, S.M.; Vale, J.A., 2006  
Sodium Fluoroacetate Poisoning  
Toxicological Reviews, **25**, 2006, 213-219
- Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R., 2006  
Biochemie  
Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
- Sakai, K.; Suzuki, H.; Oda, H.; Akaike, T.; Azuma, Y.; Murakami, T.; Sugi, K.; Ito, T.; Ichinose, H.;  
Koyasu, S.; Shirai, M., 2006  
Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthase in macrophage  
Journal of Biological Chemistry, **281**, 2006, 17736-17742
- Schwartz, D.W.; Barry, C.P., 1994  
Cellular communication through signal transduction: the background  
The Journal of Cardiovascular Nursing, **8**, 1994, 1-27
- Smital, T.; Kurelec, B., 1998  
The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new  
class of pollutants  
Mutation Research, **399**, 1998, 43-53
- Stenersen, J., 2004  
Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology  
CRC Press, Florida, 2004
- Tian, L.; Lawrence, D.A., 1995  
Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages  
Toxicology and Applied Pharmacology, **132**, 1995, 156-163
- Tsukura, Y.; Mori, M.; Hirotsu, Y.; Ikeda, K.; Amano, F.; Kato, R.; Ijiri, Y.; Tanaka, K., 2007  
Effects of capsaicin on cellular damage and monolayer permeability in human intestinal caco-2  
cells  
Biological & Pharmaceutical Bulletin, **30**, 2007, 1982-1986
- von Ballmoos, C.; Brunner, J.; Dimroth, P., 2004  
The ion channel of F<sub>1</sub>-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds  
Proceedings of the National Academy of Sciences, **101**, 2004, 11239-11244
- Walker, C.H., 1998  
Biomarker Strategies to Evaluate the Environmental Effects of Chemicals  
Environmental Health Perspectives Supplements, **138**, 1998, 613-620
- Wang, H.; Oster, G., 1998  
Energy transduction in the F<sub>1</sub> motor of ATP synthase  
Nature, **396**, 1998, 279-282

- Werlen, G.; Palmer, E., 2002  
The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity  
*Current Opinion in Immunology*, **14**, 2002, 299-305
- Wolff J., 1998  
Perchlorate and the thyroid gland  
*Pharmacological Reviews*, **50**, 1998, 89-105
- Zhao, H.B.; Kikuchi, T.; Ngezahayo, A.; White, T.W., 2006  
Gap junctions and cochlear homeostasis  
*Journal of Membrane Biology*, **209**, 2006, 177-186

## 7.3 Literatur zu Abschnitt 2

### 7.3.1 Literatur zu Abschnitt 2.1

- Barber D.S.; LoPachin R.M., 2004  
Proteomic analysis of acrylamide-protein adduct formation in rat brain synaptosomes  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **201**, 2004, 120-136
- Basile A.; Ferranti P.; Moccaldi R.; Spagnoli G.; Sannolo N., 2008  
Proteomic approach for the analysis of acrylamide-hemoglobin adducts  
*Journal of Chromatography, A*, **1215**, 2008, 74-81
- Beauchamp, R.O.; Andjelkovich, D.A.; Kligerman, A.D.; Morgan, K.T.; Heck, H.d'A., 1985  
A critical review of the literature on acrolein toxicity  
*CRC Critical Reviews in Toxicology*, **14**, 1985, 309-380
- Bisesi M.S., 1994  
Esters  
In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology (4th Edition)  
John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, 2967-3118
- Burek J.D.; Albee R.R.; Beyer J.E.; Bell T.J.; Carreon R.M.; Morden D.C.; Wade C.E.; Hermann E.A.; Gorzinski S.J., 1980  
Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery  
*Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **4**, 1980, 157-182
- Burka L.T.; Washburn K.D.; Irwin R.D., 1991  
Disposition of [<sup>14</sup>C]furan in the male F344 rat  
*Journal of Toxicology and Environmental Health*, **34**, 1991, 245-257
- Calingasan N.Y.; Uchida K.; Gibson G.E., 1999  
Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease  
*Journal of Neurochemistry*, **72**, 1999, 751-756
- Castegna A.; Lauderback C.M.; Mohammad-Abdul H.; Butterfield D.A., 2004  
Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease  
*Brain Research*, **1004**, 2004, 193-197
- Doorn J.A.; Petersen D.R., 2002  
Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal  
*Chemical Research in Toxicology*, **15**, 2002, 1445-1450
- EFSA, European Food Safety Authority, 2009  
Consideration of furfuryl alcohol and related flavouring substances evaluated by JECFA (55th meeting) structurally related to furfuryl and furan derivatives with and without additional side chain substituents and heteroatoms evaluated by EFSA in FGE  
*The EFSA Journal*, ON-752, 1009, 1-39
- EPA, Environmental Protection Agency, 1985  
Health and Environmental Effects Profile for Acrylamide

- Office of Research and Development, Washington, DC, zitiert nach  
[http://www.epa.gov/chemfact/s\\_acryla.txt](http://www.epa.gov/chemfact/s_acryla.txt)
- EPA, Environmental Protection Agency, 1994  
Integrated Risk Information System (IRIS) Online  
Cincinnati, OH: Office of Health and Environmental Assessment, zitiert nach  
[http://www.epa.gov/chemfact/s\\_acryla.txt](http://www.epa.gov/chemfact/s_acryla.txt)
- EPA, Environmental Protection Agency, 2009  
Integrated Risk Information System (IRIS). Acrylamide  
online: <http://www.epa.gov/NCEA/iris/subst/0286.htm>; Druckdatum: 2009
- Esplugues, J.V., 2002  
NO as a signalling molecule in the nervous system  
British Journal of Pharmacology, **135**, 2009, 1079-1095
- Forman H.J.; Fukuto J.M.; Torres M., 2004  
Redox signaling: Thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers  
American Journal of Physiology, **287**, 2004, C246-C256
- Friedman M., 2003  
Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide  
Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**, 2003, 4504-4526
- Gaston B., 1999  
Nitric oxide and thiol groups  
Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics, **1411**, 1999, 323-333
- Hall S.C.; Smith D.M.; Masiarz F.R.; Soo V.W.; Tran H.M.; Epstein L.B.; Burlingame A.L., 1993  
Mass spectrometric and Edman sequencing of lipocortin I isolated by two-dimensional SDS/PAGE of human melanoma lysates  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**, 1993, 1927-1931
- Hess D.T.; Matsumoto A.; Kim S.-O.; Marshall H.E.; Stamler J.S., 2005  
Protein S-nitrosylation: purview and parameters  
Nature Reviews Molecular Cell Biology, **6**, 2005, 150-166
- Keller, J.N.; Mark, R.J.; Bruce, A. J.; Blanc, E.; Rothstein, J.D.; Uchida, K.; Waeg, G.; Mattson, M.P., 1997a  
4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes  
Neuroscience, **80**, 1997, 685-696
- Keller J.N.; Pang Z.; Geddes J.W.; Begley J.G.; Germeyer A.; Waeg G.; Mattson M.P., 1997b  
Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta -peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal  
Journal of Neurochemistry, **69**, 1997b, 273-284
- Kiss J.P., 2000  
Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission  
Brain Research Bulletin, **52**, 2000, 459-466
- LoPachin R.M., 2004  
The changing view of acrylamide neurotoxicity  
Neurotoxicology, **25**, 2004, 617-630
- LoPachin R.M.; Barber D.S., 2006  
Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants  
Toxicological Sciences, **94**, 2006, 240-255
- LoPachin R.M.; Gavin T.; Geohagen B.C.; Das S., 2007  
Neurotoxic mechanisms of electrophilic type-2 alkenes: soft-soft interactions described by quantum mechanical parameters  
Toxicological Sciences, **98**, 2007, 561-570
- LoPachin R.M.; Barber D.S.; Gavin T., 2008  
Molecular mechanisms of the conjugated alpha ,beta -unsaturated carbonyl derivatives: relevance

- to neurotoxicity and neurodegenerative diseases  
*Toxicological Sciences*, **104**, 2008, 235-249
- Lovell M.A.; Xie C.; Markesbery W.R., 2001  
Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures  
*Neurobiology of Aging*, **22**, 2001, 187-194
- Luo J.; Hill B.G.; Gu Y.; Cai J.; Srivastava S.; Bhatnagar A.; Prabhu S.D., 2007  
Mechanisms of acrolein-induced myocardial dysfunction: implications for environmental and endogenous aldehyde exposure  
*American Journal of Physiology*, **293**, 2007, H3673-H3684
- Mark R.J.; Lovell M.A.; Markesbery W.R.; Uchida K.; Mattson M.P., 1997  
A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta -peptide  
*Journal of Neurochemistry*, **68**, 1997, 255-264
- Morel P.; Tallineau C.; Pontcharraud R.; Piriou A.; Huguet F., 1999  
Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat striatal synaptosomes  
*Neurochemistry International*, **33**, 1999, 531-540
- Morgan D.L.; Price H.C.; O'Connor R.W.; Seely J.C.; Ward S.M.; Wilson R.E.; Cunningham M.C., 2000  
Upper respiratory tract toxicity of inhaled methylvinyl ketone in F344 rats and B6C3F1 mice  
*Toxicological Sciences*, **58**, 2000, 182-194
- Nerland D.E.; Cai J.; Benz F.W., 2003  
Selective covalent binding of acrylonitrile to cys 186 in rat liver carbonic anhydrase III in vivo  
*Chemical Research in Toxicology*, **16**, 2003, 583-589
- Parmar D.; Burka L.T., 1993  
Studies on the interaction of furan with hepatic cytochrome P-450  
*Journal of Biochemical Toxicology*, **8**, 1993, 1-9
- Pocernich C.B.; Cardin A.L.; Racine C.L.; Lauderback C.M.; Butterfield D.A., 2001  
Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease  
*Neurochemistry International*, **39**, 2001, 141-149
- Savolainen H.; Pfaffli P., 1983  
Neurotoxicity of furfuryl alcohol vapor in prolonged inhalation exposure  
*Environmental Research*, **31**, 1983, 420-7
- Smith D.G.; Cappai R.; Barnham K.J., 2007  
The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide  
*Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, **1768**, 2007, 1976-1990
- Stamler J.S.; Lamas S.; Fang F.C., 2001  
Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism  
*Cell*, **106**, 2001, 675-683
- Subramaniam R.; Roediger F.; Jordan B.; Mattson M.P.; Keller J.N.; Waeg G.; Butterfield D.A., 1997  
The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins  
*Journal of Neurochemistry*, **69**, 1997, 1161-1169

### 7.3.2 Literatur zu Abschnitt 2.2

- Barker M.; Clackers M.; Copley R.; Demaine D.A.; Humphreys D.; Inglis G.G.A.; Johnston M.J.; Jones H.T.; Haase M.V.; House D.; Loiseau R.; Nisbet L.; Pacquet F.; Skone P.A.; Shanahan S.E.; Tape D.; Vinader V.M.; Washington M.; Uings I.; Upton R.; McLay I.M.; Macdonald S.J.F., 2006  
Dissociated nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators; discovery of the agonist trigger in a tetrahydronaphthalene-benzoxazine series  
*Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 2006, 4216-4231

- Barnett H.A.; Coe D.M.; Cooper T.W.J.; Jack T.I.; Jones H.T.; Macdonald S.J.F.; McLay I.M.; Rayner N.; Sasse R.Z.; Shipley T.J.; Skone P.A.; Somers G.I.; Taylor S.; Uings I.J.; Woolven J.M.; Weingarten G.G., 2009  
Aryl aminopyrazole benzamides as oral non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonists  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**, 2009, 158-162
- Bhatia, M.S., 1996  
Allergy to tartrazine in alprazolam  
*Indian Journal of Medical Sciences*, **50**, 2009, 285-286
- Bhatia M.S., 2000  
Allergy to tartrazine in psychotropic drugs  
*Journal of Clinical Psychiatry*, **61**, 2000, 473-476
- Biggadike K.; Boudjelal M.; Clackers M.; Coe D.M.; Demaine D.A.; Hardy G.W.; Humphreys D.; Inglis G.G.A.; Johnston M.J.; Jones H.T.; House D.; Loiseau R.; Needham D.; Skone P.A.; Uings I.; Veitch G.; Weingarten G.G.; McLay I.M.; Macdonald S.J.F., 2007  
Nonsteroidal glucocorticoid agonists: tetrahydronaphthalenes with alternative steroidal a-ring mimetics possessing dissociated (transrepression/transactivation) efficacy selectivity  
*Journal of Medicinal Chemistry*, **50**, 2007, 6519-6534
- Biggadike K.; Bledsoe R.K.; Hassell A.M.; Kirk B.E.; McLay I.M.; Shewchuk L.M.; Stewart E.L., 2008  
X-ray crystal structure of the novel enhanced-affinity glucocorticoid agonist fluticasone furoate in the glucocorticoid receptor-ligand binding domain  
*Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 2008, 3349-3352
- Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Consler T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M., Lambert M.H., Moore J.T., Pearce K.H., Xu H.E., 2002  
Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition  
*Cell*, **110**, 2002, 93-105
- Brewer J.A., Khor B., Vogt S.K., Muglia L.M., Fujiwara H., Haeghele K.E., Sleckman B.P., Muglia L.J., 2003  
T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation  
*Nature Medicine*, **9**, 2003, 1318-1322
- Clackers, M.; Coe, D.M.; Demaine, D.A.; Hardy, G.W.; Humphreys, D.; Inglis, G.G.A.; Johnston, M.J.; Jones, H.T.; House, D.; Loiseau, R.; Minick, D.J.; Skone, P.A.; Uings, I.; McLay, I.M.; Macdonald, S.J.F., 2007  
Non-steroidal glucocorticoid agonists: the discovery of aryl pyrazoles as A-ring mimetics  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 2007, 4737-4745
- DeKruyff R.H., Fang Y., Umetsu D.T., 1998  
Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production  
*Journal of Immunology*, **160**, 1998, 2231-2237
- EFSA, European Food Safety Authority, 2006  
Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil  
EFSA Scientific Report 65, 2006
- Gumy, C.; Chandsawangbhuwana, C.; Dzyakanchuk, A.A.; Kratschmar, D.V.; Baker, M.E.; Odermatt, A., 2008  
Dibutyltin disrupts glucocorticoid receptor function and impairs glucocorticoid-induced suppression of cytokine production  
*PLoS One*, **3**, 2008
- Hay R.V., Skinner R.S., Newman O.C., Kunkel S.L., Lyle L.R., Shapiro B., Gross M.D., 1997  
Scintigraphy of acute inflammatory lesions in rats with radiolabelled recombinant human interleukin-8  
*Nuclear Medicine Communications*, **18**, 1997, 367-378
- Madauss K.P., Bledsoe R.K., McLay I., Stewart E.L., Uings I.J., Weingarten G., Williams S.P., 2008  
The first X-ray crystal structure of the glucocorticoid receptor bound to a non-steroidal agonist  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 2008, 6097-6099

- Michaelsson G., Juhlin L., 1973  
Urticaria induced by preservatives and dye additives in food and drugs  
British Journal of Dermatology, **88**, 1973, 525-532
- Odermatt A., Gumy C., 2008a  
Disruption of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor-mediated responses by environmental chemicals  
Chimia, **62**, 2008, 335-339
- Odermatt A., Gumy C., 2008b  
Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals?  
Biochemical Pharmacology, **76**, 2008, 1184-1193
- Odermatt A., Gumy C., Atanasov A.G., Dzyakanchuk A.A., 2006  
Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance  
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **102**, 2006, 222-231
- Seinen W., Willems M.I., 1976  
Toxicity of organotin compounds  
Toxicology and Applied Pharmacology, **35**, 1976, 63-75
- Seinen W., Vos J.G., Van Krieken R., Penninks A., Brands R., Hooykaas H., 1977  
Toxicity of organotin compounds  
Toxicology and Applied Pharmacology, **42**, 1977, 213-224
- Shelby, M.D.; Erexson, G.L.; Hook, G.J.; Tice, R.R., 1993  
Evaluation of a three exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals  
Environmental and Molecular Mutagenesis, **21**, 1993, 160-179
- Sternberg E.M., 2006  
Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens  
Nature Reviews. Immunology, **6**, 2006, 318-328
- Suino-Powell, K.; Xu, Y.; Zhang, C.; Tao, Y.-G.; Tolbert, W.D.; Simons, S.S.; Xu, H.E., 2008  
Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol  
Molecular and Cellular Biology, **28**, 2006, 1915-1923
- van Kampen, V.; Merget, R.; Baur, X., 2000  
Occupational airway sensitizers: An overview on the respective literature  
American Journal of Industrial Medicine, **38**, 2000, 164-218
- Weliky N., Heiner D.C., 1980  
Hypersensitivity to chemicals. Correlation of tartrazine hypersensitivity with characteristic serum IgD and IgE immune response patterns  
Clinical Allergy, **10**, 1980, 375-95
- Weltman J.K., Szaro R.P., Settupane G.A., 1978  
An analysis of the role of IgE in intolerance to aspirin and tartrazine  
Allergy, **33**, 1978, 273-281
- Zuskin E., Mustajbegovic J., Schachter E.N., Doko-Jelinic J., 1997  
Respiratory function of textile workers employed in dyeing cotton and wool fibers  
American Journal of Industrial Medicine, **31**, 1997, 344-352

### 7.3.3 Literatur zu Abschnitt 2.3

- Angelopoulou, R.; Lavranos, G.; Manolakou, P., 2009  
ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology  
Reproductive Toxicology, **28**, 2009, 167-171
- Berlett B.S., Stadtman E.R., 1997  
Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress  
Journal of Biological Chemistry, **272**, 1997, 20313-20316

- Bradbury M.W., Deane R., 1993  
Permeability of the blood-brain barrier to lead  
*Neurotoxicology*, **14**, 1993, 131-136
- Cardinali M., Maradonna F., Olivotto I., Bortoluzzi G., Mosconi G., Polzonetti-Magni A.M., Carnevali O., 2004  
Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol  
*Reproductive Toxicology*, **18**, 2004, 597-604
- Caspersen C., Pedersen P.S., Treiman M., 2000  
The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein  
*Journal of Biological Chemistry*, **275**, 2000, 22363-22372
- Chiang P.-C., Chien C.-L., Pan S.-L., Chen W.-P., Teng C.-M., Shen Y.-C., Guh J.-H., 2005  
Induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis by a marine prostanoid in human hepatocellular carcinoma  
*Journal of Hepatology*, **43**, 2005, 679-686
- Coldham N.G., Sivapathasundaram S., Dave M., Ashfield L.A., Pottinger T.G., Goodall C., Sauer M.J., 1998  
Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)  
*Drug Metabolism and Disposition*, **26**, 1998, 347-354
- Davis, A.P.; Murphy, C.G.; Saraceni-Richards, C.A.; Rosenstein, M.C.; Wieggers, T.C.; Mattingly, C.J., 2009  
Comparative Toxicogenomics Database: a knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks  
*Nucleic Acids Research*, 37 (Database issue), D786-792
- de Voogt P., de Beer K., van der Wielen F., 1997  
Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples  
*Trends in Analytical Chemistry*, **16**, 1997, 584-595
- Deisseroth K., Bitto H., Tsien R.W., 1996  
Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity  
*Neuron*, **16**, 1996, 89-101
- Dhanya C.R., Indu A.R., Deepadevi K.V., Kurup P.A., 2003  
Inhibition of membrane Na(+)-K+ ATPase of the brain, liver and RBC in rats administered di(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) a plasticizer used in polyvinyl chloride (PVC) blood storage bags  
*Indian Journal of Experimental Biology*, **41**, 2003, 814-820
- Dowd T.L., Gupta R.K., 1991  
Fluorine-19 NMR study of the effect of lead on intracellular free calcium in human platelets  
*Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, **1092**, 1991, 341-346
- Finkel T., Holbrook N.J., 2000  
Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing  
*Nature*, **408**, 2000, 239-247
- Fox D.A., Rubinstein S.D., Hsu P., 1991  
Developmental lead exposure inhibits adult rat retinal, but not kidney, Na+,K(+) ATPase  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **109**, 1991, 482-493
- Gohlke, J.M.; Thomas, R.; Zhang, Y.; Rosenstein, M.C.; Davis, A.P.; Myrphy, C.; Becker, K.G.; Mattingly, C.J.; Portier, C.J., 2009  
Genetic and environmental pathways to complex diseases  
*BMC Systems Biology*, 2009, 3:46
- Gong Y., Wu J., Huang Y., Shen S., Han X., 2009  
Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress  
*Toxicology Letters*, **186**, 2009, 84-95
- Han S., Li W., Jamil U., Dargan K., Orefice M., Kemp F.W., Bogden J.D., 1999  
Effects of weight loss and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats

- with prior lead exposure  
Environmental Health Perspectives, **107**, 1999, 657-662
- Hardingham G.E., Bading H., 2003  
The Yin and Yang of NMDA receptor signalling  
Trends in Neurosciences, **26**, 2003, 81-89
- Hawrelak M., Bennett E., Metcalfe C., 1999  
The environmental fate of the primary degradation products of alkylphenol ethoxylate surfactants in recycled paper sludge  
Chemosphere, **39**, 1999, 745-752
- Hughes P.J., McLellan H., Lowes D.A., Kahn S.Z., Bilmen J.G., Tovey S.C., Godfrey R.E., Mitchell R.H., Kirk C.J., Michelangeli F., 2000  
Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pumps  
Biochemical and Biophysical Research Communications, **277**, 2000, 568-574
- Hussain, S.G.; Ramaiah, K.V., 2007  
Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging  
Biochemical and Biophysical Research Communications, **355**, 2007, 365-370
- Ikeyama S., Wang X.-T., Li J, Podlutzky A., Martindale J.L., Kokkonen G., van Huizen R., Gorospe M., Holbrook N.J., 2003  
Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitizes cells to oxidant injury  
Journal of Biological Chemistry, **278**, 2003, 16726-16731
- Inoue K., Kondo S., Yoshie Y., Kato K., Yoshimura Y., Horie M., Nakazawa H., 2001  
Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods  
Food Additives and Contaminants, **18**, 2001, 157-164
- Kaufman R.J., 1999  
Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls  
Genes & Development, **13**, 1999, 1898
- Kawaguchi M., Inoue K., Sakui N., Ito R., Izumi S.-I., Makino T., Okanouchi N., Nakazawa H., 2004  
Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples  
Journal of Chromatography, **B**, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **799**, 2004, 119-125
- Kerper L.E., Hinkle P.M., 1997a  
Cellular uptake of lead is activated by depletion of intracellular calcium stores  
Journal of Biological Chemistry, **272**, 1997, 8346-8352
- Kerper L.E., Hinkle P.M., 1997b  
Lead uptake in brain capillary endothelial cells: activation by calcium store depletion  
Toxicology and Applied Pharmacology, **146**, 1997, 127-133
- Lin D.A., Boyce J.A., 2005  
IL-4 regulates MEK expression required for lysophosphatidic acid-mediated chemokine generation by human mast cells  
Journal of Immunology, **175**, 2005, 5430-5438
- Liu P.-S., Liu G.-H., Chao W.-L., 2008  
Effects of nonylphenol on the calcium signal and catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells  
Toxicology, **244**, 2008, 77-85
- Lonze B.E., Ginty D.D., 2002  
Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system  
Neuron, **35**, 2002, 605-623
- Macario A.J.L., Conway de Macario E., 2002  
Sick chaperones and ageing: a perspective  
Ageing Research Reviews, **1**, 2002, 295-311

- McClusky L., de Jager C., Bornman M., 2007  
Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol  
*Toxicological Sciences*, **95**, 2007, 249-256
- McCullough K.D., Martindale J.L., Klotz L.-O., Aw T.-Y., Holbrook N.J., 2001  
Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state  
*Molecular and Cellular Biology*, **21**, 2001, 1249-1259
- Michelangeli F., Orlowski S., Champeil P., East J.M., Lee A.G., 1990  
Mechanism of inhibition of the calcium-magnesium ATPase by nonylphenol  
*Biochemistry*, **29**, 1990, 3091-3101
- Nagao T., Wada K., Marumo H., Yoshimura S., Ono H., 2001  
Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study  
*Reproductive Toxicology*, **15**, 2001, 293-315
- Naidoo N., Ferber M., Master M., Zhu Y., Pack A.I., 2008  
Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling  
*Journal of Neuroscience*, **28**, 2008, 6539-6548
- Naidoo N., Giang W., Galante R.J., Pack A.I., 2005  
Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex  
*Journal of Neurochemistry*, **92**, 2005, 1150-1157
- Nakazawa K., Ohno Y., 2001  
Modulation by estrogens and xenoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors  
*European Journal of Pharmacology*, **430**, 2001, 175-183
- Nimrod A.C., Benson W.H., 1996  
Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates  
*Critical Reviews in Toxicology*, **26**, 1996, 335-364
- Oliwiecki S., Beck M.H., Chalmers R.J., 1991  
Contact dermatitis from spectacle frames and hearing aid containing diethyl phthalate  
*Skin Hospital, Salford, Manchester, UK, Denmark*, 264-265
- Paz Gavilan, M.; Vela, J.; Castano, A.; Ramos, B.; del Rio, J.C.; Vitorica, J.; Ruano, D., 2006  
Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus  
*Neurobiology of Aging*, **27**, 1991, 973-982
- Qian Y., Harris E.D., Zheng Y., Tiffany-Castiglioni E., 2000  
Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **163**, 2000, 260-266
- Qian Y., Falahatpisheh M.H., Zheng Y., Ramos K.S., Tiffany-Castiglioni E., 2001  
Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells  
*Neurotoxicity Research*, **3**, 2001, 581-589
- Rabek J.P., Boylston W.H., Papaconstantinou J., 2003  
Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 2003, 566-572
- Savabieasfahani M., Kannan K., Astapova O., Evans N.P., Padmanabhan V., 2006  
Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxy-chlor on reproductive function  
*Endocrinology*, **147**, 2006, 5956-5966
- Schuetz A., Skerfving S., Christoffersson J.O., Ahlgren L., Mattson S., 1987  
Lead in vertebral bone biopsies from active and retired lead workers  
*Archives of Environmental Health*, **42**, 1987, 340-346
- Selkoe D.J., 2003  
Folding proteins in fatal ways  
*Nature*, **426**, 2003, 900-904

- Silva A.J., Kogan J.H., Frankland P.W., Kida S., 1998  
CREB and memory  
Annual Review of Neuroscience, **21**, 1998, 127-148
- Tan B.L.L., Kassim N.M., Ali Mohd M., 2003  
Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol  
Toxicology Letters, **143**, 2003, 261-270
- Toscano C.D., McGlothlan J.L., Guilarte T.R., 2003  
Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing rat brain  
Developmental Brain Research, **145**, 2003, 219-228
- Tully, D.B.; Collins, B.J.; Overstreet, J.D.; Smith, C.S.; Dinse, G.E.; Mumtaz, M.M.; Chapin, R.E., 2000  
Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells  
Toxicology and Applied Pharmacology, **168**, 2003, 79-90
- Wang H.-Q., Takahashi R., 2007  
Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease  
Antioxidants & Redox Signaling, **9**, 2007, 553-561
- Verity M.A., 1990  
Comparative observations on inorganic and organic lead neurotoxicity  
Environmental health perspectives, **89**, 1990, 43-48
- Viarengo A., Mancinelli G., Pertica M., Fabbri R., Orunesu M., 1993  
Effects of heavy metals on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity present in gill cell plasma membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam  
Comparative Biochemistry and Physiology, Part, **C**, 1993, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology 106C:655-660
- Wiemann M., Schirrmacher K., Busselberg D., 1999  
Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cells  
Calcified Tissue International, **65**, 1999, 479-485
- Yao G., Yang L., Hu Y., Liang J., Liang J., Hou Y., 2006  
Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization  
Molecular Immunology, **43**, 2006, 915-926
- Yoshida, H., 2007  
ER stress and diseases  
FEBS Journal, **274**, 2007, 630-658
- Zhang, Y.; Sun, L.; Xe, L.; Wang, B.; Li, Y., 2008  
Lead-induced stress response in endoplasmic reticulum of astrocytes in CNS  
Toxicology Mechanisms and Methods, **18**, 2008, 751-757
- Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R.T., Remotti H., Stevens J.L., Ron D., 1998  
CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum  
Genes & Development, **12**, 1998, 982-995

## **7.4 Literatur zu Abschnitt 3**

### **7.4.1 Literatur zu Abschnitt 3.1**

- Allen J.R., Barsotti D.A., Van Miller J.P., Abrahamson L.J., Lalich J.J., 1977  
Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin  
Food and Cosmetics Toxicology, **15**, 1977, 401-410

- Allan, L.L.; Schlezinger, J.J.; Shansab, M.; Sherr, D.H., 2006  
CYP1A1 in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced B lymphocyte growth suppression  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **342**, 2006, 227-235
- Bowman R.E., Heironimus M.P., Allen J.R., 1978  
Correlation of PCB body burden with behavioral toxicology in monkeys  
*Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **9**, 1978, 49-56
- Chang, K.-J.; Chen, J.-S.; Huang, P.-C.; Tung, T.-C., 1980  
Study on patients with polychlorinated biphenyls poisoning. I. Blood analyses of patients  
*Taiwan Yixuehui Zazhi*, **79**, 1980, 304-13
- Chen P.H.S., Luo M.L., Wong C.K., Chen C.J., 1984  
Polychlorinated biphenyls, dibenzofurans, and quarterphenyls in the toxic rice-bran oil and PCBs in the blood of patients with PCB poisoning in Taiwan  
*American Journal of Industrial Medicine*, **5**, 1984, 133-145
- Cook J.C., Greenlee W.F., 1989  
Characterization of a specific binding protein for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human thymic epithelial cells  
*Molecular Pharmacology*, **35**, 1989, 713-719
- Davis D., Safe S., 1988  
Immunosuppressive activities of polychlorinated dibenzofuran congeners: quantitative structure-activity relationships and interactive effects  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **94**, 1988, 141-149
- Fattore E., Trossvik C., Hakansson H., 2000  
Relative potency values derived from hepatic vitamin A reduction in male and female sprague-dawley rats following subchronic dietary exposure to individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners and a mixture thereof  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **165**, 2000, 184-194
- Gao X., Son D.-S., Terranova P.F., Rozman K.K., 1999  
Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in an ovulation model: validation of the toxic equivalency concept for one aspect of endocrine disruption  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **157**, 1999, 107-116
- Hamm J.T., Chen C.Y., Birnbaum L.S., 2003  
A mixture of dioxins, furans, and non-ortho PCBs based upon consensus toxic equivalency factors produces dioxin-like reproductive effects  
*Toxicological Sciences*, **74**, 2003, 182-191
- Harper P.A., Golas C.L., Okey A.B., 1988  
Characterization of the Ah receptor and aryl hydrocarbon hydroxylase induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benz(a)anthracene in the human A431 squamous cell carcinoma line  
*Cancer Research*, **48**, 1988, 2388-2395
- Harris M.W., Uraih L.C., Birnbaum L.S., 1989  
Acute toxicity of perfluorodecanoic acid in C57BL/6 mice differs from 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin  
*Fundamental and Applied Toxicology*, **13**, 1989, 723-736
- Haws L.C., Su S.H., Harris M., DeVito M.J., Walker N.J., Farland W.H., Finley B., Birnbaum L.S., 2006  
Development of a refined database of mammalian relative potency estimates for dioxin-like compounds  
*Toxicological Sciences*, **89**, 2006, 4-30
- Hockin L.J., Paine A.J., 1983  
The role of 5-aminolaevulinic synthase, haem oxygenase and ligand formation in the mechanism of maintenance of cytochrome P-450 concentration in hepatocyte culture  
*The Biochemical Journal*, **210**, 1983, 855-857
- Hutzinger O., Frei R.W., Merian E., Pocchiari F., 1982  
Chlorinated Dioxins and Related Compounds: Impact on the Environment. Proceedings of a Workshop held at the Ist. Superiore di Sanità, Rome, Italy, 22-24 October 1980  
Pergamon Press, Oxford, 1982

- Incardona, J.P.; Day, H.L.; Collier, T.K.; Scholz, N.L., 2006  
Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **217**, 2006, 308-321
- Kanegae H., Lal S., Kurita Y., Shigematsu N., 1987  
Experimental studies on the long-term effect of polychlorinated dibenzofurans to respiratory and immune status  
*Fukuoka Igaku Zasshi*, **78**, 1987, 219-222
- Kerkvliet N.I., 2009  
AHR-mediated immunomodulation: The role of altered gene transcription  
*Biochemical Pharmacology*, **77**, 2009, 746-760
- Lorenzen A., Okey A.B., 1991  
Detection and characterization of Ah receptor in tissue and cells from human tonsils  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **107**, 1991, 203-214
- Lubet R.A., Lemaire B.N., Avery D., Kouri R.E., 1986  
Induction of immunotoxicity in mice by polyhalogenated biphenyls  
*Archives of Toxicology*, **59**, 1986, 71-77
- Luska A., Wu L., Whitlock J.P., 1992  
Superinduction of CYP1A1 transcription by cycloheximide. Role of the DNA binding site for the liganded Ah receptor  
*Journal of Biological Chemistry*, **267**, 1992, 15146-15151
- Ma Q., Baldwin K.T., 2002  
A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor  
*Chemosphere*, **46**, 2002, 1491-1500
- Manchester D.K., Gordon S.K., Golas C.L., Roberts E.A., Okey A.B., 1987  
Ah receptor in human placenta: stabilization by molybdate and characterization of binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3-methylcholanthrene, and benzo[a]pyrene  
*Cancer Research*, **47**, 1987, 4861-4868
- Marshall N.B., Vorachek W.R., Stepan L.B., Mourich D.V., Kerkvliet N.I., 2008  
Functional characterization and gene expression analysis of CD4+CD25+ regulatory T cells generated in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin  
*Journal of Immunology*, **181**, 2008, 2382-2391
- McConnell E.E., Moore J.A., Dalgard D.W., 1978  
Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following a single oral dose  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **43**, 1978, 175-187
- Mitchell K.A., Elferink C.J., 2009  
Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity  
*Biochemical Pharmacology*, **77**, 2009, 947-956
- Nakao, T.; Aozasa, O.; Ohta, S.; Miyata, H., 2005  
Survey of human exposure to PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs using hair as an indicator  
*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **49**, 2005, 124-130
- Nebert, D.W.; Dalton, T.P., 2006  
The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis  
*Nature Reviews. Cancer*, **6**, 2006, 947-960
- Ou, X.; Ramos, K.S., 1995  
Regulation of cytochrome P4501A1 gene expression in vascular smooth muscle cells through aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction requires a protein synthesis inhibitor  
*Archives of Biochemistry and Biophysics*, **316**, 1995, 116-122
- Poland A., Glover E., 1973  
Mechanism of toxicity of the chlorinated dibenzo-p-dioxins  
*Environmental Health Perspectives*, **5**, 1973, 245-251

- Poland A., Knutson J.C., 1982  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity  
*Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **22**, 1982, 517-554
- Rogan W.J., Gladen B.C., Hung K.L., Koong S.L., Shih L.Y., Taylor J.S., Wu Y.C., Yang D., Ragan N.B., Hsu C.C., 1988  
Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan  
*Science*, **241**, 1988, 334-336
- Safe S., 2001  
PCBs as aryl hydrocarbon receptor agonists. Implications for risk assessment  
In: Robertson, L.W.; Hansen, L.G, PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects, 2001, 171-177
- Schwarz M., Appel K.E., 2005  
Carcinogenic risks of dioxin: mechanistic considerations  
*Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **43**, 2005, 19-34
- Smart R.C., Hodgson E., 2008  
Molecular and Biochemical Toxicology  
4th edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008
- Teifeld, R.M.; Fagan, J.B.; Pasco, D.S., 1989  
Transient superinducibility of cytochrome P450c (CYP1A1) mRNA and transcription  
*DNA*, **8**, 2008, 329-338
- Waithe W.I., Michaud M., Harper P.A., Okey A.B., Anderson A., 1991  
The Ah receptor, cytochrome P450IA1 mRNA induction, and aryl hydrocarbon hydroxylase in a human lymphoblastoid cell line  
*Biochemical Pharmacology*, **41**, 1991, 85-92
- Walker N.J., Crockett P.W., Nyska A., Brix A.E., Jokinen M.P., Sells D.M., Hailey J.R., Easterling M., Haseman J.K., Yin M., Wyde M.E., Bucher J.R., Portier C.J., 2005  
Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of "dioxin-like compounds"  
*Environmental Health Perspectives*, **113**, 2005, 43-48
- Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., Van Leeuwen F.X.R., Liem A.K.D., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewsk T., 1998  
Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife  
*Environmental Health Perspectives*, **106**, 1998, 775-792
- Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakanson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E., 2006  
The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds  
*Toxicological Sciences*, **93**, 2006, 223-241
- Vogelbein W.K., Unger, 2003  
Association Between Mummichog Liver Histopathology and Sediment Chemical Contamination. The Elizabeth River Monitoring Program 2001-2002  
VA Department of Environmental Quality, 2003
- Xue, W.; Warshawsky, D., 2005  
Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review  
*Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**, 2005, 73-93
- Yamazaki H., Kumahashi H., Masuda N., Kishi T., Kakiuchi Y., Watabe K., Kondo M., 1982  
Metabolism of benzo[a]pyrene in rat by oral administration  
*Chemosphere*, **11**, 1982, 337-347

## 7.4.2 Literatur zu Abschnitt 3.2

- Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., 2001  
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition  
*Biochemical Journal*, **357**, 2001, 593-615
- Aoyama T., Fujiwara H., Masaki T., Sawamura T., 1999  
Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells  
*Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **31**, 1999, 2101-2114
- Bachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V., 1978  
A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals  
*Cancer Research*, **38**, 1978, 1745-50
- Baker M.A., He S., 1991  
Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides  
*Free Radical Biology & Medicine*, **11**, 1991, 563-72
- Balazy M., 1994  
Peroxynitrite and arachidonic acid  
*Polish Journal of Pharmacology*, **46**, 1994, 593-600
- Bandyopadhyay S., Gronostajski R.M., 1994  
Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins  
*Journal of Biological Chemistry*, **269**, 1994, 29949-55
- Barret J.-M., Hill B.T., 1998  
DNA repair mechanisms associated with cellular resistance to antitumor drugs: potential novel targets  
*Anti-Cancer Drugs*, **9**, 1998, 105-123
- Beckman KB., Ames B.N., 1997  
Oxidative decay of DNA  
*Journal of Biological Chemistry*, **272**, 1997, 19633-19636
- Benowitz N.L., 2003  
Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment  
*Progress in Cardiovascular Diseases*, **46**, 2003, 91-111
- Berger N.A., Whitacre C.M., Hashimoto H., Berger S.J., Chatterjee S., 1995  
NAD and poly(ADP-ribose)  
regulation of proteins involved in response to cellular stress and DNA damage  
*Biochimie*, **77**, 1995, 364-367
- Borlakoglu J.T., Edwards-Webb J.D., Dils R.R., 1991  
Evidence for the induction of fatty acid desaturation in proliferating hepatic endoplasmic reticulum in response to treatment with polychlorinated biphenyls  
*International Journal of Biochemistry*, **23**, 1991, 925-931
- Bouchard V.J., Rouleau M., Poirier G.G., 2003  
PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage  
*Experimental Hematology*, **31**, 2003, 446-454
- Brook R.D., Brook J.R., Urch B., Vincent R., Rajagopalan S., Silverman F., 2002  
Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults  
*Circulation*, **105**, 2002, 1534-1536
- Brook R.D., Franklin B., Cascio W., Hong Y., Howard G., Lipsett M., Luepker R., Mittleman M., Samet J., Smith Sidney C, Jr  
*Circulation*, **109**, 2004, 2655-2671
- Calabrese C.R., Almassy R., Barton S., Batey M.A., Calvert A.H., Canan-Koch S., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Kumpf R.A., Kyle S., Li J., Maegley K., Newell D.R., Notarianni E., Stratford I.J., Skalitzy D., Thomas H.D., Wang L.-Z., Webber S.E., Williams K.J., Curtin N.J., 2004  
Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose)

- polymerase-1 inhibitor AG14361  
*Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 2004, 56-67
- Chen K.-H., Srivastava D.K., Singhal R.K., Jacob S., Ahmed A.E., Wilson S.H., 2000  
Modulation of base excision repair by low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and antioxidants in mouse monocytes  
*Carcinogenesis*, **21**, 2000, 1017-1022
- Cho A.K., Di Stefano E., You Y., Rodriguez C.E., Schmitz D.A., Kumagai Y., Miguel A.H., Eiguren-Fernandez A., Kobayashi T., Avol E., Froines J.R., 2004  
Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649a, and atmospheric PM2  
*Aerosol Science and Technology*, **38**, 2004, 68-81
- Cipollone F., Fazia M.L., Mezzetti A., 2007  
Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development  
*International Congress Series*, **1303**, 2007, 35-40
- Cominacini L., Garbin U., Pasini A.F., Davoli A., Campagnola M., Pastorino A.M., Gaviraghi G., Lo Cascio V., 1998  
Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intracellular reactive oxygen species in endothelial cells: inhibitory effect of lacidipine  
*Journal of Hypertension*, **16**, 1998, 1913-1919
- Culotta E., Koshland D.E., 1994  
DNA repair works its way to the top  
*Science*, **266**, 1994, 1926-1929
- Curtin N.J., Wang L.-Z., Yiakoukaki A., Kyle S., Arris C.A., Canan-Koch S., Webber S.E., Durkacz B.W., Calvert H.A., Hostomsky Z., Newell D.R., 2004  
Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells  
*Clinical Cancer Research*, **10**, 2004, 881-889
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A., 2006  
Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression  
*Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **10**, 2006, 389-406
- de Murcia G., de Murcia J.M., 1994  
Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor  
*Trends in Biochemical Sciences*, **19**, 1994, 172-6
- Delaney C.A., Wang L.-Z., Kyle S., White A.W., Calvert A.H., Curtin N.J., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Newell D.R., 2000  
Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines  
*Clinical Cancer Research*, **6**, 2000, 2860-2867
- Dellinger B., Pryor W.A., Cueto R., Squadrito G.L., Hegde V., Deutsch W.A., 2001  
Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter  
*Chemical Research in Toxicology*, **14**, 2001, 1371-1377
- Demple B., Harrison L., 1994  
Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology  
*Annual Review of Biochemistry*, **63**, 1994, 915-48
- Dockery D.W., Pope C.A., Xu X., Spengler J.D., Ware J.H., Fay M.E., Ferris B.G., Speizer, F.E., 1993  
An association between air pollution and mortality in six U.S. cities  
*The New England Journal of Medicine*, **329**, 1993, 1753-9
- Edara S., Kanugula S., Pegg A.E., 1999  
Expression of the inactive C145A mutant human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in E  
*Carcinogenesis*, **20**, 1999, 103-108
- Fissithaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder D.A., Fleming I., Busse A., 1999  
Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries  
*Nature*, **401**, 1999, 493-497
- Fraga C.G., Tappel A.L., 1988  
Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices  
*Biochemical Journal*, **252**, 1988, 893-6

- Fraley A.E., Tsimikas S., 2006  
Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease  
*Current Opinion in Lipidology*, **17**, 2006, 502-509
- Glantz Stanton A., 2002  
Air pollution as a cause of heart disease  
*Journal of the American College of Cardiology*, **39**, 2002, 943-5
- Gold D.R., Litonjua A., Schwartz J., Lovett E., Larson A., Nearing B., Allen G., Verrier M., Cherry R., Verrier R., 2000  
Ambient pollution and heart rate variability  
*Circulation*, **101**, 2000, 1267-73
- Gong K.W., Zhao W., Li N., Barajas B., Kleinman M., Sioutas C., Horvath S., Lusic A.J., Nel A., Araujo J.A., 2007  
Air-pollutant chemicals and oxidized lipids exhibit genome-wide synergistic effects on endothelial cells  
*GenomeBiology*, **8**, 2007, No pp given
- Greife A.L., Warshawsky D., 1993  
Influence of the dose levels of cocarcinogen ferric oxide on the metabolism of benzo[a]pyrene by pulmonary alveolar macrophages in suspension culture  
*Journal of Toxicology and Environmental Health*, **38**, 1993, 399-417
- Griffin R.J., Curtin N.J., Newell D.R., Golding B.T., Durkacz B.W., Calvert A.H., 1995  
The role of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase as resistance-modifying agents in cancer therapy  
*Biochimie*, **77**, 1995, 408-22
- Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J.A., 2004  
Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and aggresomes during oxidative stress, aging, and disease  
*International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 2004, 2519-2530
- Gurgueira S.A., Lawrence J., Coull B., Murthy G.G.K., Gonzalez-Flecha B., 2002  
Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation  
*Environmental Health Perspectives*, **110**, 2002, 749-755
- Hamers T., van Schaardenburg M.D., Felzel E.C., Murk A.J., Koeman J.H., 2000  
The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution  
*Science of the Total Environment*, **262**, 2000, 159-174
- Heinloth A., Heermeier K., Raff U., Wanner C., Galle J., 2000  
Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells  
*Journal of the American Society of Nephrology*, **11**, 2000, 1819-1825
- Hirano S., Furuyama A., Koike E., Kobayashi T., 2003  
Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells  
*Toxicology*, **187**, 2003, 161-170
- Hoek G., Brunekreef B., Goldbohm S., Fischer P., van den Brandt Piet A., 2002  
Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study  
*Lancet*, **360**, 2002, 1203-1209
- Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A., Fishman M.C., 1995  
Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase  
*Nature*, **377**, 1995, 239-232
- Huang Z.-H., Tang D.-G., 2008  
Estimation of vehicle toxic air pollutant emissions in China  
*Huanjing Kexue Yanjiu*, **21**, 2008, 166-170

- Huber A., Bai P., Menissier de Murcia J., de Murcia G., 2004  
PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development  
*DNA Repair*, **3**, 2004, 1103-1108
- Ibald-Mulli A., Stieber J., Wichmann H.E., Koenig W., Peters A., 2001  
Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach  
*American Journal of Public Health*, **91**, 2001, 571-577
- Ikeda M., Shitashige M., Yamasaki H., Sagai M., Tomita T., 1995  
Oxidative modification of low density lipoprotein by diesel exhaust particles  
*Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **18**, 1995, 866-871
- Inoue T., Inoue K., Maeda H., Takayanagi K., Morooka S., 2001  
Immunological response to oxidized LDL occurs in association with oxidative DNA damage independently of serum LDL concentrations in dyslipidemic patients  
*Clinica Chimica Acta*, **305**, 2001, 115-121
- Kalapila A.G., Loktionova N.A., Pegg A.E., 2008  
Alkyltransferase-mediated toxicity of 1,3-butadiene diepoxide  
*Chemical Research in Toxicology*, **21**, 2008, 1851-1861
- Kappus H., Sies H., 1981  
Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation  
*Experientia*, **37**, 1981, 1233-1241
- Kashiwakura K., Sasaki S., Sakamoto K., 2009  
Emissions of regulated and non-regulated air pollutants emitted from gasoline vehicles and their emission tendencies  
*Taiki Kankyo Gakkaishi*, **44**, 2009, 102-116
- Kataoka H., Kume N., Miyamoto S., Minami M., Moriwaki H., Murase T., Sawamura T., Masaki T., Hashimoto N., Kita T., 1999  
Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions  
*Circulation*, **99**, 1999, 3110-3117
- Knowles R.G., Moncada S., 1994  
Nitric oxide synthases in mammals  
*Biochemical Journal*, **298**, 1994, 249-58
- Kumagai Y., Hayashi T., Miyauchi T., Endo A., Iguchi A., Kiriya-Sakai M., Sakai S., Yuki K., Kikushima M., Shimojo N., 2001  
Phenanthraquinone inhibits eNOS activity and suppresses vasorelaxation  
*American Journal of Physiology*, **281**, 2001, R25-R30
- Lautier D., Lagueux J., Thibodeau J., Menard L., Poirier G.G., 1993  
Molecular and biochemical features of poly(ADP-ribose) metabolism  
*Molecular and Cellular Biochemistry*, **122**, 1993, 171-193
- Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A., 2003  
Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage  
*Environmental Health Perspectives*, **111**, 2003, A 269
- Loeber R., Rajesh M., Fang Q., Pegg A.E., Tretyakova N., 2006  
Cross-linking of the human DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of 1,2,3,4-diepoxybutane  
*Chemical Research in Toxicology*, **19**, 2006, 645-654
- Loecken E.M., Guengerich F.P., 2008  
Reactions of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase sulfhydryl groups with bis-electrophiles produce DNA-protein cross-links but not mutations  
*Chemical Research in Toxicology*, **21**, 2008, 453-458
- Luksha L., Agewall S., Kublickiene K., 2009  
Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease  
*Atherosclerosis*, **202**, 2009, 330-344

- Margison G.P., Santibanez-Koref M.F., 2002  
O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy  
*BioEssays*, **24**, 2002, 255-266
- Margison, G.P.; Povey, A.C.; Kaina, B.; Santibanez Koref, M.F., 2003  
Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase  
*Carcinogenesis*, **24**, 2003, 625-635
- Marietta M.A., 1994  
Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis  
*Cell*, **78**, 1994, 927-930
- Martinet W., Knaapen M.W.M., De Meyer G.R.Y., Herman A.G., Kockx M.M., 2002  
Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques  
*Circulation*, **106**, 2002, 927-932
- Mason G.G.F., 1994  
Dioxin-receptor ligands in urban air and vehicle exhaust  
*Environmental Health Perspectives Supplements*, **102**, 1994, 111-16
- Meek M.D., 1998  
Ah receptor and estrogen receptor-dependent modulation of gene expression by extracts of diesel exhaust particles  
*Environmental Research*, **79**, 1998, 114-121
- Mehta J.L., Li D.Y., 1998  
Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **248**, 1998, 511-514
- Milstien S., Katusic Z., 1999  
Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **263**, 1999, 681-684
- Moller P., Wallin H., 1998  
Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product  
*Mutation Research, Reviews in Mutation Research*, **410**, 1998, 271-290
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., 1991  
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology  
*Pharmacological Reviews*, **43**, 1991, 109-42
- Morel Y., Barouki R., 1998  
Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress  
*Journal of Biological Chemistry*, **273**, 1998, 26969-26976
- Moriwaki H., Kume N., Sawamura T., Aoyama T., Hoshikawa H., Ochi H., Nishi E., Masaki T., Kita T., 1998  
Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein  
*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **18**, 1998, 1541-1547
- Nathan C., 1992  
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells  
*FASEB Journal*, **6**, 1992, 3051-3064
- Nathan C., Xie Q.-W., 1994  
Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls  
*Cell*, **78**, 1994, 915-918
- Nguewa P.A., Fuertes M.A., Valladares B., Alonso C., Perez J.M., 2005  
Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions  
*Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **88**, 2005, 143-172
- Pegg A.E., 2000  
Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases  
*Mutation Research, Reviews in Mutation Research*, **462**, 2000, 83-100

- Pegg A.E., Dolan M.E., Moschel R.C., 1995  
Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase  
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, **51**, 1995, 167-223
- Penn A., Snyder C.A., 1993  
Inhalation of sidestream cigarette smoke accelerates development of arteriosclerotic plaques  
Circulation, **88**, 1993, 1820-5
- Penn A., Snyder C.A., 1996  
1,3-Butadiene, a vapor phase component of environmental tobacco smoke, accelerates arteriosclerotic plaque development  
Circulation, **93**, 1996, 552-7
- Penn A., Snyder C.A., 2007  
1,3-Butadiene exposure and cardiovascular disease  
Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **621**, 2007, 42-49
- Penn A., Butler J., Snyder C., Albert R.E., 1983  
Cigarette smoke and carbon monoxide do not have equivalent effects upon development of arteriosclerotic lesions  
Artery, **12**, 1983, 117-31
- Penn A., Nath R., Pan J., Chen L.C., Widmer K., Henk W., Chung F.-L., 2001  
1,N2-propanodeoxyguanosine adduct formation in aortic DNA following inhalation of acrolein  
Environmental Health Perspectives, **109**, 2001, 219-224
- Peters A., Perz S., Doring A., Stieber J., Koenig W., Wichmann H.E., 1999  
Increases in heart rate during an air pollution episode  
American Journal of Epidemiology, **150**, 1999, 1094-8
- Pieper A.A., Verma A., Zhang J., Snyder S.H., 1999  
Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death  
Trends in Pharmacological Sciences, **20**, 1999, 171-181
- Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V., 1996  
Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kB, and glutathione S-transferase gene expression  
Journal of Biological Chemistry, **271**, 1996, 13422-13429
- Pope C.A., Verrier R.L., Lovett E.G., Larson A.C., Raizenne M.E., Kanner R.E., Schwartz J., Villegas G.M., Gold D.R., Dockery D.W., 1999  
Heart rate variability associated with particulate air pollution  
American Heart Journal, **138**, 1999, 890-899
- Pope C.A., Burnett R.T., Thurston G.D., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Godleski J.J., 2004  
Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease  
Circulation, **109**, 2004, 71-77
- Rees D.D., Palmer R.M.J., Moncada, S., 1989  
Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **86**, 1989, 3375-3378
- Rifkind A.B., Lee C., Chang T.K.H., Waxman D.J., 1995  
Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes  
Archives of Biochemistry and Biophysics, **320**, 1995, 380-389
- Rueckschloss U., Galle J., Holtz J., Zerkowski H.-R., Morawietz H., 2001  
Induction of NAD(P) oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells  
Circulation, **104**, 2001, 1767-1772
- Ruf A., Rolli V., De Murcia G., Schulz G.E., 1998  
The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis  
Journal of Molecular Biology, **278**, 1998, 57-65

- Ryan M.J., Sigmund C.D., 2004  
ACE, ACE inhibitors, and other JNK  
Circulation Research, **94**, 2004, 1-3
- Sander M., Chavoshan B., Victor R.G., 1999  
A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans  
Hypertension, **33**, 1999, 937-42
- Satoh M.S., Lindahl T., 1994  
Enzymatic repair of oxidative DNA damage  
Cancer Research, **54**, 1994, 1899s-1901s
- Sawamura T., Kume N., Aoyama T., Moriwaki H., Hoshikawa H., Aiba Y., Tanaka T., Miwa S., Katsura Y., Kita T., Masaki T., 1997  
An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein  
Nature, **386**, 1997, 73-77
- Schmidt H.H.H.W., Walter U., 1994  
NO at work  
Cell, **78**, 1994, 919-25
- Schuetzle D., 1983  
Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing  
Environmental Health Perspectives, **47**, 1983, 65-80
- Schuetzle D., Lee F.S.C., Prater T.J., Tejada S.B., 1981  
The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts  
International Journal of Environmental Analytical, **Chemistry**, 1981, 93-144
- Shall S., De Murcia G., 2000  
Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?  
Mutation Research, DNA Repair, **460**, 2000, 1-15
- Singh V.K., Patel D.K., Jyoti, Ram S., Mathur N., Siddiqui M.K.J., 2008  
Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices - An Indian perspective  
Clinical Biochemistry, **41**, 2008, 152-161
- Stadtman E.R., Levine R.L., 2003  
Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins  
Amino Acids, **25**, 2003, 207-218
- Sun Q., Wang A., Jin X., Natanzon A., Duquaine D., Brook R.D., Aguinaldo J.-G.S., Fayad Z.A., Fuster V., Lippmann M., Chen L.C., Rajagopalan S., 2005  
Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model  
Journal of the American Medical Association, **294**, 2005, 3003-3010
- Sun Y., Taguchi K., Sumi D., Yamano S., Kumagai Y., 2006  
Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity and suppression of endothelium-dependent vasorelaxation by 1,2-naphthoquinone, a component of diesel exhaust particles  
Archives of Toxicology, **80**, 2006, 280-285
- Suzuki T., Kohno H., Hasegawa A., Toshima S., Amaki T., Kurabayashi M., Nagai R., 2002  
Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease  
Clinical Biochemistry, **35**, 2002, 347-353
- Tentori L., Portarena I., Bonmassar E., Graziani G., 2001a  
Combined effects of adenovirus-mediated wild-type p53 transduction, temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in mismatch repair deficient and non-proliferating tumor cells  
Cell Death and Differentiation, **8**, 2001a, 457-469
- Tentori L., Portarena I., Vernole P., De Fabritiis P., Madaio R., Balduzzi A., Roy R., Bonmassar E., Graziani G., 2001b  
Effects of single or split exposure of leukemic cells to temozolomide, combined with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on cell growth, chromosomal aberrations and base excision repair

- components  
Cancer Chemotherapy and Pharmacology, **47**, 2001b, 361-369
- Tentori L., Portarena I., Graziani G., 2002  
Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors  
Pharmacological Research, **45**, 2002, 73-85
- Thor H., Smith M.T., Hartzell P., Orrenius S., 1982  
Toxic and nontoxic pathways during metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) in isolated hepatocytes  
Developments in Biochemistry, **23**, 1982, 729-732
- Thum T., Borlak J., 2004  
Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury  
Circulation Research, **94**, 2004, e1-e13
- Thum T., Borlak J., 2008  
LOX-1 receptor blockade abrogates oxLDL-induced oxidative DNA damage and prevents activation of the transcriptional repressor oct-1 in human coronary arterial endothelium  
Journal of Biological Chemistry, **283**, 2008, 19456-19464
- Tubbs J.L., Pegg A.E., Tainer J.A., 2007  
DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy  
DNA Repair, **6**, 2007, 1100-1115
- Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M., 1998  
Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions  
Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **400**, 1998, 99-115
- Wenger D., Gerecke A.C., Heeb N.V., Zennegg M., Kohler M., Naegeli H., Zenobi R., 2008  
Secondary effects of catalytic diesel particulate filters: reduced aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of the exhaust  
Environmental Science and Technology, **35**, 2008, 1748-1754
- Westerholm, R.; Christensen, A.; Toernqvist, M.; Ehrenberg, L.; Rannug, U.; Sjoegren, M.; Rafter, J.; Soontjens, C.; Almen, J.; Graegg, K., 2001  
Comparison of exhaust emissions from swedish environmental classified diesel fuel (MK1) and European Program on Emissions, Fuels and Engine Technologies (EPEFE) reference fuel: a chemical and biological characterization, with viewpoints on cancer risk  
Environmental Science and Technology, **35**, 2001, 1748-1754
- Wingler K., Wunsch S., Kreutz R., Rothermund L., Paul M., Schmidt H.H.H.W., 2001  
Upregulation of the vascular NAD(P)-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo  
Free Radical Biology & Medicine, **31**, 2001, 1456-1464
- Virag L., Szabo C., 2002  
The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors  
Pharmacological Reviews, **54**, 2002, 375-429
- Wiseman C.L.S., Zereini F., 2009  
Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: A review of recent evidence  
Science of the Total Environment, **407**, 2009, 2493-2500
- Xiao G.G., Wang M., Li N., Loo J.A., Nel A.E., 2003  
Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line  
Journal of Biological Chemistry, **278**, 2003, 50781-50790
- Yan X., Su S., Chen J., Wen C., Li L., Geng J., 2007  
Survey of hazards of chemical poisons in a petrochemical enterprise  
Zhongguo Redai Yixue, **7**, 2007, 1480-1481
- Yang D., Tang Y.-C., Chen J., Wang X.-C., Bartberger M.D., Houk K.N., Olson L., 1999  
Ketone-catalyzed decomposition of peroxyxynitrite via dioxirane intermediates  
Science, **297**, 1999, 259-263

- Yu, S.-W.; Wang, H.; Poitras, M.F.; Coombs, C.; Bowers, W.J.; Federoff, H.J.; Poirier, G.G.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L., 2002  
Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor  
*Science*, **297**, 2002, 259-263
- Yang, Z.; Lloyd, S.; Postlethwait, E.; Ballinger, S.W., 2004  
Butadiene exposure mediates oxidative stress and mitochondrial damage  
*Free Radical Biology & Medicine*, **37**, 2004, S145

### 7.4.3 Literatur zu Abschnitt 3.3

- Canistro, D.; Pozzetti, L.; Sapone, A.; Broccoli, M.; Affatato, A.A.; Stradiotti, A.; Longo, V.; Menichini, P.; Barale, R.; Paolini, M., 2008  
Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures  
*Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2008, 34-42
- Ghisari, M.; Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2005  
Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells  
*Molecular and Cellular Endocrinology*, **244**, 2005, 31-41
- Ghisari, M.; Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2009  
Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions  
*Toxicology Letters*, **189**, 2009, 67-77
- Kodavanti, P.R.S.; Ward, T.R., 2005  
Differential effects of commercial polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl mixtures on intracellular signaling in rat brain in vitro  
*Toxicological Sciences*, **85**, 2005, 952-962
- Lini, M.P.; Ozzetti, L.; Sapone, A.; Camerino, A.; Cantelli-Forti, G., 1998  
Testosterone hydroxylase as multibiomarker of effect in evaluating vinclozolin cocarcinogenesis  
*Biomarkers*, **3**, 1998, 191-203
- Paolini, M.; Pozzetti, L.; Mesirca, R.; Sapone, A.; Cantelli-Forti, G., 1996  
Testosterone hydroxylase in evaluating induction and suppression of murine CYP isoenzymes by fenarimol  
*Archives in Toxicology*, **70**, 1996, 451-456
- Rider, C.V.; LeBlanc, G.A., 2005  
An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures  
*Toxicological Sciences*, **87**, 2005, 520-528
- Sapone, A.; Pozzetti, L.; Canistro, D.; Broccoli, M.; Bronzetti, G.; Potenza, G.; Affatato, A.; Biagi, G.L.; Cantelli-Forti, G.; Paolini, M., 2005  
CYP superfamily perturbation by diflubenzuron or acephate in different tissues of CD1 mice  
*Food and Chemical Toxicology*, **43**, 2005, 173-183
- Tanida, T.; Warita, K.; Ishihara, K.; Fukui, S.; Mitsuhashi, T.; Sugawara, T.; Tabuchi, Y.; Nanmori, T.; Qi, W.M.; Inamoto, T.; Yokoyama, T.; Kitagawa, H.; Hoshi, N., 2009  
Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei  
*Toxicology Letters*, **189**, 2009, 40-47
- Valerón, P.F.; Pestano, J.J.; Luzardo, O.P.; Zumbado, M.L.; Almeida, M.; Boada, L.D., 2009  
Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination  
*Chemico-Biological Interactions*, **180**, 2009, 485-491

### 7.5 Literatur zu Abschnitt 4

- Bath P.A., Poirette A.R., Willett P., Allen F.H., 1994  
Similarity searching in files of 3-dimensional chemical structures – comparison of fragment-based

- measures of shape similarity  
Journal of Chemical Information and Computer Sciences, **34**, 1994, 141-147
- Boethling R.S., Mackay D., 2000  
Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals – Environmental and Health Sciences  
Lewis Publisher, Boca Raton
- Bonchev, D.; Rouvray, D.H., 1990  
Chemical graph theory. introduction and fundamentals  
Gordon and Breach Science Publishers
- Cramer, R.D., Redl, G., Berkoff, C.E., 1974  
Substructural analysis: A novel approach to the problem of drug design  
Journal of Medicinal Chemistry, **17**, 1974, 533-535
- Cronin, M.T.D., 2003  
Computer aided prediction of drug toxicity and metabolism  
In: Hillisch A., Hilgenfeld R. (Hrsg.) Modern Methods of Drug Discovery, Birkhäuser, Basel, 2003
- Ekins, S., 2007  
Computational Toxicology. Risk Assessment for Pharmaceutical and Environmental Chemicals  
Wiley
- Eriksson, L., Jaworska, J.S., Worth, A.P., Cronin, M.T.D., McDowell, R.M., Gramatica, P., 2003  
Methods for reliability, uncertainty assessment, and applicability evaluations of classification and regression based QSARs  
Environmental Health Perspectives, **22**, 2003, 1361-1375
- Free, S.M., Wilson, J.W., 1964  
A mathematical contribution to structure activity studies  
Journal of Medicinal Chemistry, **7**, 1964, 395-399
- Gallegos-Saliner, A.; Poater, A.; Jeliakova, N.; Patlewicz, G.; Worth, A.P., 2008  
Toxmatch - A chemical classification and activity prediction tool based on similarity measures  
Regulatory Toxicology and Pharmacology, **52**, 2008, 77-84
- Gasteiger, J., Engels, T., 2003  
Cheminformatics  
Wiley VCH, Weinheim, 2003
- Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., Wendoloski, J.J., 1999  
A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery  
J. Combin. Chem, **1**, 1999, 55-68
- Hall, L.H., Kier, L.B., 1994  
Electrotopological state indexes for atom types – a novel combination of electronic, topological, and valence state information  
Journal of Chemical Information and Computer Sciences, **35**, 1994, 1039-1045
- Hillisch, A., Hilgenfeld, R., 2003  
Modern Methods of Drug Discovery  
Birkhäuser, Basel, 2003
- Johnson, A.M., Maggiora, G.M., 1990  
Concepts and Applications of Molecular Similarity  
Wiley, New York, 1990
- Lahana, R., 1999  
How many leads from HTS?  
Drug Discovery Today, **4**, 1999, 447-448
- Leach, A.R., Gillet, V.J., 2003  
An Introduction to Cheminformatics  
Kluwer Academic Publishers, 2003
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997  
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings  
Adv. Drug. Del. Des., **23**, 1997, 3-25
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001  
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings  
Adv. Drug Del. Rev., **46**, 2001, 3-26

- Matthews, E.J.; Contrera, J.F., 2007  
In silico approaches to explore toxicity end points: issues and concerns for estimating human health effects  
Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, **3**, 2007, 125-134
- Simon-Hettich, B.; Rothfuss, A.; Steger-Hartmann, T., 2006  
Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances  
Toxicology, **224**, 2006, 156-162
- Todesini, R.; Casonni, V., 2009  
Molecular Descriptors for Chemoinformatics  
Wiley-VCH, Weinheim, 2009
- Walker, J.D.; Jaworska, J.; Comber, M.H. I.; Schultz, T. W.; Dearden, J.C., 2003  
Guidelines for developing and using quantitative structure-activity relationships  
Environ. Toxicol. Chem., **22**, 2003, 1653-1665

## 7.6 Literatur zu Abschnitt 5

- Agusto, K., 2009  
EPA ToxCast™ Program Update  
ChemADVISORY, **46**, 2009, 8
- Andersen, M.E.; Krewski, D., 2009  
Toxicity testing in the 21st century: bringing the vision to life  
Toxicological Sciences, **107**, 2009, 324-330
- Davis, A.P.; Murphy, C.G.; Saraceni-Richards, C.A.; Rosenstein, M.C.; Wiegers, T.C.; Mattingly, C.J., 2009  
Comparative Toxicogenomics Database: a knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks  
Nucleic Acids Research, **37** (Database issue), 2009, D786-792
- Dix, D., 2007  
EPA's ToxCast Program for Predicting Hazard and Prioritizing the Toxicity Testing of Environmental Chemicals. Presented at Society for Risk Analysis 2007 Annual Meeting, San Antonio, TX, December 09 - 12, 2007  
[EPAs ToxCast Program for Predicting Hazard and Prioritizing the Toxicity Testing of Environmental Chemicals \(slide\)](#)
- EPA, Environmental Protection Agency, 2009  
The U.S: Environmental Protection Agency's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals  
U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC  
<http://www.epa.gov/spc/toxicitytesting/>
- Hartung, T., 2009  
A toxicology for the 21st century - Mapping the road ahead  
Toxicological Sciences, **109**, 2009, 18-23
- Houck, K.A.; Kavlock, R.J., 2008  
Understanding mechanisms of toxicity: Insights from drug discovery research  
Toxicology and Applied Pharmacology, **277**, 2008, 163-178
- Judson, R.; Richard, A.; Dix, D.; Houck, K.; Elloumi, F.; Martin, M.; Cathey, T.; Transue, T.R.; Spencer, R.; Wolf, M., 2008  
ACToR - Aggregated computational toxicology resource  
Toxicology and Applied Pharmacology, **233**, 2008, 7-13
- Judson, R.; Richard, A.; Dix, D.J.; Houck, K.; Martin, M.; Kavlock, R.; Dellarco, V.; Henry, T.; Holderman, T.; Sayre, P.; Tan, S.; Carpenter, T.; Smith, E., 2009  
The toxicity data landscape for environmental chemicals  
Environmental Health Perspectives, **117**, 2009, 685-695
- Judson, R.S.; Houck, K.A.; Kavlock, R.J.; Knudsen, T.B.; Martin, M.T.; Mortensen, H.M.; Reif, D.M.; Rotroff, D.M.; Shah, I.; Richard, A.M.; Dix, D.J., 2010

- In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project  
Environmental Health Perspectives, **118**, 2010, 485-492
- Kavlock, R.J.; Dix, D.J.; Houck, K.A.; Judson, R.S.; Martin, M.T.; Richard, A.M., 2008  
ToxCast™: Developing predictive signatures for chemical toxicity  
AATEX: Alternatives to Animal Testing and Experimentation, **14**, 2008, 623-627
- Kavlock, R.J.; Austin, C.P.; Tice, R.R., 2009  
Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment  
Risk Analysis, **29**, 485-487
- Mattingly, C.J.; Rosenstein, M.C.; Davis, A.P.; Colby, G.T.; Forrest, J.N., Jr.; Boyer, J.L., 2006  
The comparative toxicogenomics database: a cross-species resource for building chemical-gene interaction networks  
Toxicological Sciences, **92**, 2006, 587-595
- Meek, B.; Doull, J., 2009  
Pragmatic challenges for the vision of toxicity testing in the 21<sup>st</sup> century in a regulatory context: another Ames test? ... or a new edition of "the Red book"?  
Toxicological Sciences, **108**, 2009, 19-21
- NRC, National Research Council, 2007  
Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy  
The National Academies Press, Washington, DC  
[www.nap.edu/catalog/11970.html](http://www.nap.edu/catalog/11970.html), 2007
- Reichl, F.-X.; Schwenk, M., 2004  
Regulatorische Toxikologie. Gesundheitsschutz-Umweltschutz-Verbraucherschutz  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2004
- Richard, A.M., 2006  
Future of toxicology - predictive toxicology: an expanded view of "chemical toxicity"  
Chemical Research in Toxicology, **19**, 2006, 1257-1262
- Richard, A., 2009  
US EPA Computational Toxicology Programs: Central Role of Chemical-annotation Efforts & Molecular Databases  
<http://acscinf.org/docs/meetings/238nm/presentations/238nm01.pdf>
- Schleger, C.; Krebsfaenger, N.; Kalkuhl, A.; Bader, R.; Singer, T., 2001  
Innovative cell culture methods in drug development  
ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten, **18**, 2001, 5-8
- WHO, World Health Organization, 1999  
Environmental Health Criteria 212, Principles and Methods for Assessing Allergic Hypersensitization Associated with Exposure to Chemicals  
IPCS, International Programme on Chemical Safety; World Health Organization, Geneva, 1999
- Williams-Devane, C.R.; Wolf, M.A.; Richard, A.M., 2009  
Toward a public toxicogenomics capability for supporting predictive toxicology: survey of current resources and chemical indexing of experiments in GEO and ArrayExpress  
Toxicological Sciences, **109**, 2009, 358-371

## 7.7 Literatur zu Abschnitt 6

- Bal-Price, A.K.; Hogberg, H.T.; Buzanska, L.; Coecke, S., 2010  
Relevance of in vitro neurotoxicity testing for regulatory requirements: challenges to be considered  
Neurotoxicology and Teratology, **32**, 2010, 36-41
- Boekelheide, K.; Campion, S.N., 2010  
Toxicity testing in the 21st century: using the new toxicity testing paradigm to create a taxonomy of adverse effects  
Toxicological Sciences, **114**, 2010, 20-24
- Breier, J.M.; Gassmann, K.; Kayser, R.; Stegeman, H.; De Groot, D.; Fritsche, E.; Shafer, T.J., 2010  
Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity:

state of the science

Neurotoxicology and Teratology, **32**, 2010, 4-15

Edelstein, M.; Buchwald, F.; Richter, L.; Kramer, S., 2010

Integrating background knowledge from internet databases into predictive toxicology models  
SAR and QSAR in Environmental Research, **21**, 2010, 21-35

Judson, R.S.; Houck, K.A.; Kavlock, R.J.; Knudsen, T.B.; Martin, M.T.; Mortensen, H.M.; Reif, D.M.;  
Rotroff, D.M.; Shah, I.; Richard, A.M.; Dix, D.J., 2010

In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project  
Environmental Health Perspectives, **118**, 2010, 485-492