



**This is a postprint of an article published in
Bilitewski, Ursula
Biochemische Methoden in der Wasseranalytik - Stand der Technik und
Perspektiven - Teil. II: Organismische Tests
Vom Wasser-das Journal, 104 (3) pp.7-19.**

Biochemische Methoden in der Wasseranalytik – Stand der Technik und Perspektiven,

Teil II: Organismische Tests

FA „Biochemische Arbeitsmethoden“ im HA III der Wasserchemischen Gesellschaft in der GDCh

Kontakt: Ursula Bilitewski*, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt.

Naturstoffbiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, ursula.bilitewski@gbf.de

Zusammenfassung

In der Wasseranalytik werden organismische Tests vor allem zur Beurteilung der biologischen Wirkung einer Probe eingesetzt. Testorganismen sind Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, tierische oder menschliche Zellkulturen, oder komplexe Lebewesen, wie Krebstiere (Daphnien), Fadenwürmer (*C. elegans*), Fische (Goldorfe, Zebrafisch), Mäuse und Ratten. Die Wirkung einer Probe auf diese Organismen wird anhand unterschiedlicher Testprotokolle und Parameter analysiert und bewertet. Toxische oder potentiell schädigende Umgebungsbedingungen bedeuten für den betroffenen Organismus Stresssituationen, die zu Schäden an einzelnen Biomolekülen oder an komplexeren makromolekularen Strukturen im Organismus führen können, wie zum Beispiel zu Oxidationen von Nukleinsäuren (DNA), Proteinen oder Lipiden, zu DNA-Strangbrüchen oder zu Zerstörungen des Zellgerüsts (Zytoskeletts). Diese Effekte können eine direkte Konsequenz der Exposition sein, können aber auch Sekundäreffekte sein, die zum Beispiel aus geänderten Proteinaktivitäten durch Wechselwirkung mit Probenbestandteilen resultieren. Ist der Umfang dieser Schäden begrenzt, besitzen Zellen in der Regel Reparaturmechanismen, so dass weitergehende Beeinträchtigungen eines komplexeren Gesamtorganismus oder einer Organismenpopulation vermieden werden. Die erwähnten molekularen Veränderungen können prinzipiell mit jedem Testorganismus detektiert werden, der die zu untersuchende Struktur besitzt. So können

gentoxische Effekte mit tierischen oder menschlichen Zellkulturen, oder sogar mit Bakterien erkannt werden, da unter dem Begriff „Gentoxizität“ alle Störungen des genetischen Materials zusammengefasst werden.

**Biochemical methods for water analysis – state of the art and perspectives, part II:
Assays based on whole organisms**

FA „Biochemical Methods“ in the Waterchemical Society of the GDCh

Corresponding author: Ursula Bilitewski*, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
mbH, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, ursula.bilitewski@gbf.de

Summary

In water analysis tests on the basis of whole organisms are used to evaluate the biological effects of samples. Suitable test organisms are microorganisms, such as bacteria or yeasts, animal or human cell lines, but also animals, such as daphnia, nematodes, fish, mice or rats. The effect of a sample on these organisms is detected and evaluated by a variety of test parameters and protocols. Any toxic or adverse condition represents a stress situation for the exposed organism, which can lead to the damage of biomolecules or macromolecular structures within the organism, such as oxidations of DNA, proteins or lipids, breaks of strands of nucleic acids or disruption of the cytoskeleton. These effects can be the direct consequence of the exposure, but may also be secondary effects resulting for example from changes of activities of proteins due to interactions between proteins and respective sample constituents. Those changes on the molecular level can be detected with any test organism containing the respective molecular structure. Thus, genotoxic effects can be detected using animal or human cell cultures or even bacteria, as “genotoxicity” summarizes all disturbances

of the genetic material, such as changes of the DNA sequence (mutations), inductions of DNA strand breaks or the integrity of nuclei.

Einleitung

Traditionell werden in der Umweltüberwachung Tests mit lebenden Organismen, sogenannte Biotests, vor allem für die Beurteilung kurzfristiger toxischer Auswirkungen eingesetzt [1, 2]. Dabei wird in der Regel die Überlebensrate, Wachstumsgeschwindigkeit oder Stoffwechselaktivität der exponierten Organismen erfasst. In diese Kategorie gehören damit der Fischeitest und der Daphnientest, aber auch mikrobielle Tests, wie der Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida*, oder der Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* (s. z.B. Trinkwasser- und Abwasserverordnung).

Außerdem lassen sich mit Hilfe von Mikroorganismen summarische Aussagen zur chemischen Zusammensetzung von Proben machen. So zeigt der Biochemische Sauerstoffbedarf (BOD₅) die Gesamtbelastung von Wasser mit biologisch abbaubaren Substanzen an. Durch die Verwendung spezieller Bakterienstämme konnten mikrobielle Testsysteme auch zur Erfassung der Belastungen mit chlorierten Kohlenwasserstoffen oder Schwermetallen entwickelt werden. Als Messparameter dient häufig der Sauerstoffverbrauch durch die Stoffwechsellistung der Mikroorganismen, so dass Sensorsysteme durch Kopplungen von immobilisierten Mikroorganismen mit Sauerstoffelektroden beschrieben wurden [3]. Diese mikrobiellen Sensoren sind durch eine relativ breite Substratspezifität gekennzeichnet, wobei die Sensitivität jedoch substanzabhängig ist. Damit können zwar Angaben zur Belastung in Substanzäquivalenten (bezogen auf eine „Leitsubstanz“) aber keine absoluten Konzentrationsangaben gemacht werden..

Für einen umfassenden Schutz von Ökosystemen und der Bevölkerung vor Gefährdungen durch Wasserinhaltsstoffe ist die summarische Erfassung von chemischen Parametern und der Nachweis akut toxischer Wirkungen jedoch nicht ausreichend. Auch eine (chronische)

Exposition von Lebewesen mit Substanzen, die keine akute toxische Gefährdung darstellen, kann langfristig zu Veränderungen im Ökosystem führen, wenn diese Substanzen in natürliche Prozesse von Organismen eingreifen. Neben Beeinflussungen des Hormonhaushaltes [4, 5] durch natürliche Östrogene, aber auch durch Rückstände aus Hormonpräparaten, sowie durch Industriechemikalien und Pestizide [6] sind mittlerweile gentoxische [7], immuntoxische [8, 9] und neurotoxische Wirkungen von Substanzen zum Teil bei niedrigen, nicht akut toxisch wirksamen Konzentrationen [10, 11] bekannt, genauso wie schädigende Einflüsse auf verschiedene Organe, wie Leber oder Nieren. Es existieren nur in einzelnen Fällen molekulare oder einfache zelluläre Tests, um diese „unerwünschten Wirkungen“ von Substanzen zu erfassen, da die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen vielfältig und im Detail noch nicht aufgeklärt sind und geeignete Zellsysteme sowie analytische Endpunkte für entsprechende *in vitro* Tests fehlen. Zur Erfassung werden daher Untersuchungen insbesondere an Nagetieren, d.h. Mäusen und Ratten, durchgeführt, für die es vor allem im Zusammenhang mit der Chemikalienprüfung entsprechende Richtlinien der OECD gibt. Sie sind bis jetzt für die Wasserüberwachung noch nicht vorgeschrieben (s. z.B. Trinkwasser- und Abwasserverordnung).

Im Folgenden wird auf Systeme, bei denen die quantitative Bestimmung von chemischen Parametern mit organismischen Tests im Mittelpunkt steht (BOD₅, Substanzäquivalente, Schwermetalle), nicht weiter eingegangen. Stattdessen liegt der Schwerpunkt auf organismischen Tests, die zur Erkennung unerwünschter Wirkungen eingesetzt werden. Dabei werden nicht nur die in den Verordnungen zur Wasserüberwachung verankerten Tests vorgestellt. Vielmehr wird auch auf die in der Chemikalienprüfung verwendeten Tests auf komplexere toxische Eigenschaften, sowie auf Forschungsansätze zur Entwicklung entsprechender *in vitro* Tests eingegangen, da diese in Zukunft gegebenenfalls auch auf Fragestellungen aus der Wasserüberwachung angewandt werden könnten.

Wirkungen einer Probe auf exponierte Testorganismen können anhand der Integrität der Struktur oder Funktion ausgewählter Biomoleküle (Nukleinsäuren (DNA), Proteine), zellulärer Komponenten (Zellkern, Zytoskelett) oder ausgewählter Organfunktionen (Lebensfähigkeit, hormonelles System, Immunsystem, Nervensystem) erkannt werden. Wie in Abb. 1 am Beispiel von Untersuchungen auf neurotoxische Effekte vereinfacht dargestellt, können strukturelle Schäden und die Beeinträchtigung ausgewählter zellulärer Aktivitäten auch durch Zellkultur-basierte Tests erfaßt werden, während Störungen spezifischer komplexer Funktionen (z.B. Lernverhalten, Muskelbeweglichkeit, Sinnesorgane) nur durch Untersuchungen an Tieren erkannt werden können. Allerdings sind auch diese komplexen Effekte letztlich auf Störungen zellulärer Funktionen oder molekularer biochemischer Reaktionen zurückzuführen. So sind Schädigungen von Nukleinsäuren oder am Zellkern zunächst Indikatoren für eine genotoxische Wirkung. Diese kann die Lebensfähigkeit der betroffenen Zellen oder die Regulation intrazellulärer Reaktionen beeinträchtigen, und damit Organfunktionen stören oder der erste Schritt bei der Entstehung von Krebs sein. Im Unterschied zu Tests auf molekulare und strukturelle Integrität zeigen Tests auf akut-toxische, immuntoxische oder neurotoxische Effekte Störungen von physiologischen Reaktionen oder Organfunktionen an, die eine Vielzahl von molekularen Ursachen haben können.

Dementsprechend wird im Folgenden zunächst auf Tests an molekularen und zellulären Strukturen in exponierten Organismen eingegangen und dann auf Untersuchungen zur Funktionalität und Lebensfähigkeit von Organen oder Organismen. Dabei werden auch die biologischen Grundlagen der jeweiligen Tests kurz beschrieben, um so ihre Relevanz für die Beurteilung der verschiedenen toxischen Effekte diskutieren zu können. Auf eine detaillierte Beschreibung der Durchführung der Tests wird dagegen in der Regel verzichtet. Ausgeklammert sind noch die Tests, bei denen die Erfassung der molekularen Ausstattung der Testorganismen im Mittelpunkt steht. Dazu gehören Untersuchungen mit DNA-Mikroarrays oder DNA-Chips zur Erfassung der Gesamtheit der vom Testorganismus unter den

Testbedingungen genutzten Gene (Genexpressionsanalytik oder Transkriptomics), sowie die Erfassung der Gesamtheit der gebildeten Proteine (Proteomics) und Metabolite (Metabolomics). Sie werden in einem separaten Beitrag zusammen mit den Ansätzen zur Kopplung chemischen und biologischer Analysenmethoden beschrieben (Teil III).

Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Biomolekülen

Genetisches Material - Gentoxizität

Unter Gentoxizität wird die Eigenschaft einer Probe verstanden, das genetische Material in Organismen zu schädigen. Sie führt zum Beispiel zur Schädigung der Chromosomen-Struktur oder Fragmentierung der Nukleinsäuren, insbesondere der DNA, oder zu erhöhten Mutationsraten, d. h. Veränderungen in der Sequenz der DNA. Derartige Schädigungen können zum Entstehen von Krebs, aber auch zur Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit von Organen, wie dem Immunsystem, führen. Die Prüfung auf gentoxische Effekte ist im Chemikaliengesetz und seinen Verordnungen vorgeschrieben und beruht auf Untersuchungen zur Integrität des genetischen Materials.

Die Schädigung der Chromosomenstruktur wird im sogenannten Mikrokerntest erfasst. Werden Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke durch Schädigungen des Spindelapparates oder der Zentromerregion nicht zu den Kernregionen der Tochterzellen bewegt, verbleiben sie im Zytosol, umgeben sich mit einer Hülle und werden so zu Mikrokernen. Diese haben einen Durchmesser von höchstens einem Drittel des Zellkerns [7]. Die Detektion erfolgt durch spezifische Anfärbung von Zellkernen und die Bestimmung des Anteils von Zellen mit Mikrokernen an der gesamten Zellpopulation. Dieser Test wurde ursprünglich als *in vivo* – Test entwickelt, d. h. die Mikrokernbestimmung wurde als Biomarker für gentoxische Effekte verwendet. Da er einfach und mit einer Vielzahl von Zelltypen (Säugerzelllinien, Fischzelllinien, Zellen aus aquatischen Organismen) durchführbar

ist, erlangt er zunehmend als *in vitro* Test Bedeutung, bei dem Zellen mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und anschließend analysiert werden [7, 12].

DNA-Strangbrüche lassen sich durch den sogenannten Comet Assay detektieren. In diesem Test werden Zellen mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und die DNA nach alkalischer Behandlung ($\text{pH} > 12$) gelelektrophoretisch untersucht. Die alkalische Behandlung führt zur Entspiralisierung der doppelsträngigen DNA. Durch die Gelelektrophorese wandern Bruchstücke der DNA, die zum Beispiel aus einer Fragmentierung der DNA resultieren, aus dem ursprünglichen Zellkernbereich heraus und bilden sogenannte Kometen. Da die Analyse einzelner Zellen möglich ist, kann das Ausmaß der Gen-Schädigung in der Gesamtzellpopulation festgestellt werden. Dieser Test benötigt nur sehr wenig Material und ist auf alle Organismen, die einen Zellkern besitzen, anwendbar [7, 12].

Schädigungen der DNA – Struktur lösen außerdem in den Zellen komplexe biochemische Prozesse aus, die zur Reparatur oder Elimination der beschädigten DNA führen (Abb. 2). Dies wird im umu-Test (DIN 38415-3, ISO 13829) ausgenutzt, in dem die Induktion dieses Reparatursystems in *Salmonella typhimurium* mit der Synthese leicht nachweisbarer Proteine (β -Galaktosidase als Reporterprotein) gekoppelt wird [7, 13]. Aber auch die Beeinträchtigung des Wachstums von *Escherichia coli* – Stämmen, die die DNA - Reparatursysteme nicht mehr besaßen, wurde zur Detektion gentoxischer Verbindungen genutzt [14].

Im Ames-Test (DIN 38415-4, ISO/CD 16240) wird dagegen das Potential einer Probe, Mutationen auszulösen, detektiert. Vom Testorganismus *Salmonella typhimurium* wird eine Mutante verwendet, die sich nur vermehren kann, wenn dem Standardmedium eine bestimmte Aminosäure zugesetzt wird. Führen Substanzen in der zu untersuchenden Probe häufig zu Mutationen, wird mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit die auslösende Mutation aufgehoben, und der Organismus kann sich auch wieder unter Standardbedingungen vermehren [7].

Zytoskelett – Zytotoxizität

Das Zytoskelett ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Röhren und Filamenten, das vom Zellkern ausgeht und bis zur Zellmembran reicht [15]. Es dient in tierischen Zellen der Stabilisierung der Zellarchitektur und verleiht der Zelle ihre äußere Gestalt, die durch dynamischen Umbau des Zytoskeletts ständig an Erfordernisse angepasst und optimiert werden kann. Störungen dieser Prozesse beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der Zellen und führen zu toxischen Effekten. Auch für die Adhäsion oder Fortbewegung von Zellen, sowie die Aufnahme von Fremdkörpern aus der Zellumgebung durch Phagozytose wird ein intaktes Zellgerüst benötigt. So führen Schädigungen des Zytoskeletts in Zellen des Immunsystems, zum Beispiel in Makrophagen, zur Schwächung der Immunabwehr des Organismus [16].

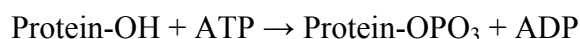
Veränderungen der Strukturen des Zytoskeletts lassen sich auf verschiedene Ursachen zurückführen: Durch direkte Wechselwirkungen von zytotoxischen Substanzen mit den filamentbildenden Proteinen wird deren Polymerisation oder der Abbau der Filamente inhibiert. In anderen Fällen sind kovalente Veränderungen der an dem Filamentaufbau beteiligten Proteine die Ursache für eine veränderte Stabilität. So wurde in Blutzellen aus Muscheln eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch aromatische Kohlenwasserstoffe [Benzo(a)pyren] beobachtet, die auf den durch Aktivierung von CytochromP450 ausgelösten oxidativen Stress zurückgeführt wurde [17], der möglicherweise zur Oxidation von Proteinen führte (s.u.). Einige Algentoxine, wie zum Beispiel die Okadasäure, sind Inhibitoren von Proteinphosphatasen und beeinflussen damit den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine (s.u.), also auch von Proteinen des Zytoskeletts, und damit möglicherweise deren Fähigkeit, stabile Filamente auszubilden [18]. Als Folge der Exposition von Nervenzellen mit verschiedenen marinen Toxinen, die von Algen (Dinoflagellaten) gebildet werden, wie der Okadasäure, den Pectenotoxinen [19, 20] oder Azaspiraziden [21], wurde nämlich eine Zerstörung der Mikrofilamente beobachtet. Diesen Effekt lösten allerdings auch Toxine aus, die keine Inhibitoren von Proteinphosphatasen sind [20, 21].

Um die Zerstörung von Aktinfilamenten zu quantifizieren, wurde ein fluorimetrischer Test etabliert, der auch in Mikrotiterplatten durchführbar und damit prinzipiell automatisierbar ist [19, 22]. Dabei wurden Nervenzellen in Mikrotiterplatten mit der zu untersuchenden Probe und anschließend mit einem fluoreszierenden Marker für filamentöses Aktin inkubiert. Bei diesem Marker handelte es sich um ein Phallotoxinderivat, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden war. Phallotoxine sind Pilzgifte, die an die Aktin-Filamente binden und diese stabilisieren [probes.invitrogen.com], so dass eine abnehmende Fluoreszenz als quantitatives Maß für die Zerstörung der Filamente diente. Dieser Test wurde bislang nur zum Nachweis von Toxinen in Muschelproben im Vergleich zum Maus-Bioassay und Phosphatase-Inhibitionstests angewandt [22]. Er hat das Potential, die Zerstörung einer essentiellen Zellstruktur, des Zytoskeletts, die verschiedene molekulare biochemische Ursachen und unterschiedliche physiologische Konsequenzen haben kann, in einem relativ einfachen, automatisierbaren Test anzuzeigen.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen - Tumorpromotoren

Der Phosphorylierungszustand von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Reaktionen zum Beispiel als Antwort auf extrazelluläre Signale. Dabei katalysieren Proteinkinasen die Phosphorylierung insbesondere der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, während Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung katalysieren (s.a. Abb. 2) (Gl. 1, 2).

(1) Proteinkinasen



(2) Proteinphosphatasen



Signaltransduktionskaskaden umfassen in der Regel mehrere dieser Enzyme, deren Aktivität in einer zeitlichen Abfolge reguliert wird. Störungen können nicht nur die oben bereits

erwähnten Zerstörungen des Zytoskeletts verursachen und den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen, sondern auch die Immunabwehr beeinflussen, also zu immuntoxischen Effekten führen [23]. Sie werden auch für die Ausbildung von Krebs verantwortlich gemacht. So hängen die Eigenschaften einiger mariner Toxine, wie der Microcystine und der Okadasäure, als Tumorpromotoren mit der Hemmung der Proteinphosphatase1 und 2A zusammen [24]. Aus diesem Grund sind Proteinphosphatase-Aktivitätstests als *in vitro* – Tests [25] oder als Biomarker für eine *in vivo* Microcystin-Exposition [26] verbreitet. Wird die *in vivo*-Aktivität überprüft (Biomarker), muß die zu untersuchende enzymhaltige Probe (Zellextrakt oder Eluat einer Chromatographiesäule [27]) nur mit einem geeigneten Phosphatase-Substrat, wie p-Nitrophenylphosphat, inkubiert werden.

Die Bedeutung von Kinasen für die biologische Wirkung von Umweltsubstanzen wurde bislang überwiegend indirekt gezeigt, das heißt es wurden Aktivierungen von Kinasen in exponierten Zellkulturen oder Tieren nachgewiesen. So hängt die Wirkung von Aplysiatoxinen aus Blaualgen und Meeresschnecken als Tumorpromotoren mit der Aktivierung von Proteinkinasen, insbesondere der Proteinkinase C zusammen [24]. Cadmium führt in Brustkrebszellen über Aktivierung von Kinasen aus der Familie der Phosphatidylinositol 3- Kinasen zur Phosphorylierung des Tumorsuppressor-Proteins p53. Die Phosphorylierung dieses Proteins führt zu seiner Aktivierung und damit zu einer Beeinflussung der Regulation des Zellzyklus, so dass sie wahrscheinlich wichtig für die von Cadmium induzierten zellulären Schäden ist [28]. Auch von Arsenit ist beschrieben, dass es zur Aktivierung von Kinasen führt [29], genauso wie von Benzo(a)pyren und anderen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen [30]. Hier sind allerdings Kinasen aus der Familie der sogenannten MAP Kinasen (Mitogen aktivierte Protein Kinasen) betroffen, insbesondere die, die über extrazellulären Stress reguliert werden (ERK1/2). MAP Kinasen werden auch bei der Immunabwehr durch das unspezifische angeborene Immunsystem

(Neutrophile aus Wirbeltieren oder Hemozyten aus Muscheln) aktiviert, so dass Inhibitoren immuntoxische Wirkungen haben [z.B. 23]

Die Aktivierung von Kinasen wird in der Regel über Phosphorylierung von Substratproteinen nachgewiesen. Dabei werden die zellulären Proteine aus den Organismen extrahiert, gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Blot) und dort mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen phosphorylierten Proteine inkubiert (Western Blot). Dieses Verfahren ist wenig automatisierbar und zeitintensiv (2 Tage), kann aber mit Proteinen sowohl aus Zellkulturen als auch aus exponierten Tieren durchgeführt werden. Als mögliche Alternative und Grundlage für Routine - *in vitro* – Tests wurden Tests entwickelt, bei denen adhärent wachsende Zelllinien in Mikrotiterplatten (96 er oder 384 er) kultiviert und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurden. Nach Fixierung und anschließender Permeabilisierung der Zellen wurde die Phosphorylierung einzelner Proteine mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern direkt in den Zellen nachgewiesen [31, 32]. Diese Tests waren ähnlich zeitaufwändig wie das vorher beschriebene Format, sind allerdings deutlich besser automatisierbar und parallelisierbar. Bislang wurden sie allerdings nur für Untersuchungen von Signalkaskaden im Zusammenhang mit pharmazeutisch bedeutsamen Substanzen eingesetzt, und nicht zur Untersuchung toxischer Effekte von Wasserproben.

Wegen der Bedeutung von Kinasen für die Krebsentstehung gibt es im Bereich des Wirkstoffscreenings noch eine Reihe anderer Kinasetestformate, die vor allem auf der Detektion der Phosphorylierung von enzymespezifischen Peptidsubstraten beruhen. Hier soll nur noch ein kürzlich vorgestellter homogener fluorimetrischer Test erwähnt werden, bei dem die für die jeweilige Kinase spezifischen Substratpeptide mit einer Sensorpeptid-Einheit gekoppelt werden, die bei Phosphorylierung des Substrats zur Bildung eines fluoreszierenden Chelats führt (www.biosource.com). Diese Peptide können direkt mit dem zu untersuchenden Zelllysats (oder einer rekombinanten Kinase) inkubiert werden, wobei die

Anstiegsgeschwindigkeit der Fluoreszenz ein Maß für die Kinaseaktivität ist. Für verschiedene Kinasen müssen unterschiedliche Peptide verwendet werden.

Spezifische Kinaseinhibitoren werden auch als Pharmazeutika verwendet, so dass „Kinaseaktivitätsfingerprints“ als Indikatoren für toxische oder andere „unerwünschte Wirkungen“ dienen könnten. Dies ist jedoch noch nicht ausreichend systematisch untersucht und damit validiert.

Oxidation von Biomolekülen - Oxidativer Stress

Sauerstoff ist für eine Vielzahl von Reaktionen in aeroben Organismen essentiell, sein Verbrauch führt aber gleichzeitig zur intrazellulären Bildung potentiell toxischer, reaktiver Substanzen. Dementsprechend haben alle Organismen Abwehrsysteme entwickelt, die für diese Grundbelastung einen ausreichenden Schutz bieten. Durch verschiedene Schadstoffe wird jedoch die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies so erhöht, dass es zur Oxidation von Biomolekülen kommt, die Auswirkungen auf deren Funktionalität, den Redoxzustand in der Zelle und damit auch auf die Funktionalität des Organismus haben kann. Beispiele für solche Schadstoffe sind Schwermetalle, wie Blei, und aromatische Kohlenwasserstoffe, die die CytochromP450 Monooxygenasen induzieren und zusätzlich selber in reaktive Derivate überführt werden. Untersuchungen zu möglichen oxidativen Schädigungen durch Testsubstanzen lassen sich *in vitro* an Zellkulturen, aber auch mit Bakterienstämmen durchführen.

Oxidierende Bedingungen werden in Zellen durch die Oxidation von Glutathion, einem Peptid aus den Aminosäuren Cystein, Glycin und Glutaminsäure, kompensiert, wobei aus der reduzierten monomeren Form (GSH) das oxidierte Dimer (GSSG) gebildet wird. Dementsprechend zeigen erniedrigte GSH-Konzentrationen bzw. ein niedriges GSH:GSSG-Verhältnis an, dass die Organismen oxidativem Stress ausgesetzt waren. GSH kann über

HPLC [33] oder nach Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd [34] fluorimetrisch bestimmt werden.

Weiterreichende Veränderungen betreffen Oxidationen von Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden, die zu Struktur- und Funktionsveränderungen bis hin zum völligen Funktionsverlust führen können. Oxidative DNA-Schädigungen wurden nach Exposition von Tieren mit Organochlorverbindungen, wie polychlorierten Biphenylen (PCBs), beobachtet. Als wichtigster Biomarker dafür wird 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) betrachtet [35].

In Proteinen werden vor allem die Thiol – und Aminogruppen haltigen, sowie die aromatischen Aminosäuren oxidiert, was zur Carbonylierung, Nitrierung oder Quervernetzung der Proteine führt [36]. Die Relevanz oxidativer Proteinschädigungen wird vor allem im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, diskutiert [37]. Carbonylierte Proteine können zum Beispiel in exponierten Zellkulturen nach Derivatisierung mit 2,4 – Dinitrophenylhydrazin und gelelektrophoretischer Proteintrennung mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden [36].

In Lipiden werden vor allem die mehrfach ungesättigten Fettsäurereste oxidiert, wobei unter anderem Malondialdehyd (MDA) entsteht, das deshalb als Index für Lipidoxidation betrachtet wird [37] und nach Derivatisierung mit Thiobarbitursäure über HPLC [33] bestimmt werden kann.

Als Schutz vor oxidativem Stress werden in Organismen Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die letzten Endes zur Aktivierung der zugehörigen Stressabwehr-Genregulationsnetzwerke und damit zu einer Neusynthese von Stressabwehr-Proteinen führen. In Abb. 2 sind die durch reaktive Substanzen (reaktive Sauerstoffspezies, Stickstoffspezies, aber auch elektrophile organische Substanzen) in Zellen möglichen Schädigungen zusammen mit Effekten anderer Stressfaktoren schematisch zusammengefasst. Wie beschrieben, lassen sich die einzelnen Schädigungen (Lipidmembranen, Proteine, DNA) einzeln analysieren. Sie lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, an denen verschiedene

stressassoziierte Kinasen beteiligt sind, die schließlich zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, d.h. der Expression von Genen und Neusynthese von Proteinen, führen. Dabei werden in der Regel Proteine gebildet, die allgemein an der Stressabwehr beteiligt sind (z.B. die sogenannten Hitzeschockproteine), und andere Proteine für die Abwehr spezifischer Stressbedingungen. Dazu gehören beim oxidativen Stress zum Beispiel Katalasen, Peroxidasen und Superoxiddismutasen, die die chemische Inaktivierung der verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies katalysieren, sowie Glutathion-Reduktasen, -Peroxidasen und – S-Transferasen, die zur Regenerierung des Glutathions führen. Auch die Aktivitäten dieser Enzyme werden daher sowohl bei Exposition von Mikroorganismen und Zellkulturen, als auch von Tieren als Biomarker für oxidativen Stress verwendet.

Zusätzlich wurde dieses Prinzip der Aktivierung von Stressabwehrregulationsnetzwerken für die Konstruktion von bakteriellen Reporterstämmen ausgenutzt, in denen die Aktivierung der Stressgenexpression mit der Synthese leicht nachweisbarer Proteine, wie β -Galactosidase oder Luziferase, gekoppelt wurde [38, 39]. Dieser Ansatz erlaubt durch Kombination verschiedener Stämme den raschen Nachweis sehr unterschiedlicher stressauslösender Faktoren, indem jeweils die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren erfasst wird, hat aber bis jetzt noch keine weite Verbreitung gefunden. Je nachdem, mit welchem Transkriptionsfaktor das Signal gekoppelt ist, erhält man eher summarische, unspezifische oder aber mechanistische, spezifische Informationen.

Beeinträchtigung der Funktionalität von Organen und Organismen

Mit den bisher beschriebenen Untersuchungen wird die strukturelle Integrität und Funktionalität von Biomolekülen in nahezu beliebig wählbaren Organismen überprüft. Damit sind mit ihnen Aussagen zu molekularen Schädigungen möglich, die in der Folge die Vitalität oder Funktionalität des gesamten Organismus oder Organs betreffen können. Dabei können unterschiedliche molekulare Ursachen zu ähnlichen Schädigungen des Gesamtsystems führen.

So führen Schädigungen von Nervenzellen zu neurotoxischen Symptomen, unabhängig davon, ob die Ursache zum Beispiel in genotoxischen Effekten oder im oxidativen Stress zu suchen ist. Im folgenden sollen nun Methoden vorgestellt werden, mit denen die Funktionalität der Organe oder Organismen untersucht wird.

Allgemeine Toxizität

Mikroorganismen werden bereits seit vielen Jahren eingesetzt, um negative Effekte von Abwasser oder von Chemikalien auf die Abwasserreinigung zu detektieren. Dabei wird im einfachsten Fall die Hemmung der Atmung bzw. des Wachstums heterotropher Bakterien beobachtet. Durch Verwendung entsprechender Bakterien lässt sich dieses Prinzip auf die Detektion einer möglichen Hemmung spezieller Abbauewege erweitern. So gibt es neben den genormten Tests mit heterotrophen Bakterien (z.B. DIN 38412- L27, EN ISO 10712:1995) oder mit Bakterienmischkulturen (Atmungshemmtest mit Belebtschlamm OECD 209:1984) auch solche mit nitrifizierenden Bakterien (EN ISO 9509:1995) und mit Anaerobiern (ISO 13641-1:2003 und -2:2003).

Der erfolgreichste Toxizitätstest ist sicher der Biolumineszenztest (EN ISO 11348-1:1998, - 2:1998 und -3:1998, DIN 38412 – Teil 314), mit den Testorganismen *Photobacterium phosphoreum* bzw. *Vibrio fischeri* [1, 2] (ToxAlert[®], Microtox[®]). Diese Organismen gehören zu den Leuchtbakterien, d.h. sie strahlen Licht als Folge eines ungestörten Stoffwechsels aus (Biolumineszenz). Bei Beeinträchtigung der Stoffwechselleistung durch Chemikalien oder andere Komponenten in einer Umweltprobe nimmt die Lichtemission ab [40]. Der Test ist einfach und schnell durchführbar, da die Testorganismen in einer gebrauchsfertigen Form kommerziell erhältlich sind und nur mit der zu untersuchenden Probe inkubiert werden müssen. Nach einer Reaktionszeit von 15 – 60 min. wird die Lichtemission gemessen [2] und mit der nach Inkubation mit einer Kontrollprobe verglichen. Viele toxische Substanzen werden bereits in niedrigen Konzentrationen erkannt. Deshalb wird der Test zur

Überwachung überwiegend von gering kontaminiertem Wasser, wie Grundwasser, Oberflächenwasser oder Kläranlagenausläufen, oder in der Chemikalienprüfung eingesetzt. Allerdings ist zu beachten, dass auch einige nicht-toxische Substanzen zu Hemmeffekten führen können, bzw. antimikrobielle Aktivitäten von Pharmazeutika möglicherweise nicht erkannt werden [40]. Letzteres wurde auch für den Respirationshemmtest mit Belebtschlamm beschrieben, wobei allerdings bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 h Hemmeffekte beobachtet wurden [41]. Dementsprechend ist die Aussagekraft dieser Tests für toxische oder andere unerwünschte Effekte auf andere Organismen nur begrenzt gegeben, und diese Tests werden vor allem als Frühwarnsysteme eingesetzt.

Die akute Toxizität von Substanzen oder Proben auf tierische Zellen lässt sich über den sogenannten „Neutralrot-Aufnahme“-Test bestimmen. Neutralrot wird nur von lebenden Zellen über Endozytose aufgenommen, tote Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Dementsprechend werden Zellen nach Inkubation mit der zu untersuchenden Probe und Neutralrot-haltigem Medium mit einer Extraktionslösung behandelt und der aufgenommene Farbstoff photometrisch bestimmt. Ein zunehmender Anteil toter Zellen führt zur Erniedrigung von Signalen [42]. Alternativ werden zytotoxische Effekte über die Reduktion von Tetrazolium-Salzen (z.B. MTT: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromid) durch intrazelluläre Dehydrogenasen erfasst [43, 44]. Das Salz wird zu Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase gegeben und durch Reduktion in ein blaues Formazan umgewandelt. Die Reaktion wird vor allem durch Succinat-Dehydrogenasen der Mitochondrien katalysiert, so dass die Signale sinken, wenn die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen abnimmt. Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Zytotoxizitätstests lassen sich darauf zurückführen, dass die einzelnen Tests Störungen in der Funktionalität unterschiedlicher Strukturen in den Organismen anzeigen (Neutralrot: Lysosomen; MTT: Mitochondrien), die durchaus substanzabhängig sind.

Zu einer umfassenderen Beurteilung der Wasserqualität müssen auch toxische Wirkungen auf aquatische Lebewesen berücksichtigt werden, so dass es eine Reihe entsprechender Toxizitätstests gibt [2]. Dazu gehören zum Beispiel Tests mit Krebstieren (Daphnien, DIN 38412-L11) oder Fischen (DIN 38412-13), bei denen die Schwimmfähigkeit bzw. Mortalität der Tiere nach Exposition mit dem Wasser untersucht wird. Um die Zahl der benötigten Fische zu reduzieren (etwa 50 – 80 für die Ermittlung eines einzigen LC_{50} -Wertes), wurden zum einen ein Fischeitest (DIN 38415-6) und zum anderen Tests mit Fischzelllinien entwickelt [2].

Hemmung der Photosynthese

Mit dem Algentest (ISO 8692, OECD test guideline 201) sollen chronische toxische Effekte auf Grünalgen, z. B. *Scenedesmus subspicatus*, entdeckt werden. Da das Wachstum dieser Algen durch Licht stimuliert wird und damit von der photosynthetischen Aktivität der Organismen abhängig ist, zeigt dieser Test vor allem inhibitorische Effekte auf die Photosynthese an. Als Indikator wird die Chlorophyll-Fluoreszenz oder aber die Zellzahl bestimmt. Eine reduzierte Chlorophyll-Fluoreszenz ist der Indikator für eine Hemmung der Photosynthese, insbesondere des Photoreaktionszentrums II. Der Test wurde nicht nur in konventionellen Kultivierungsgefäßen, sondern zur Erhöhung des Durchsatzes auch im miniaturisierten Format in Mikrotiterplatten etabliert.

Werden die Zellen zusätzlich mit Fluorescein diacetat (FDA) (nicht-fluoreszierend) behandelt, lässt sich auch noch der Einfluss der Probe auf die Lebensfähigkeit der Organismen detektieren, da FDA nur von lebensfähigen Zellen in fluoreszierendes Fluorescein gespalten wird [45]. Toxische Effekte werden üblicherweise nach 24 h [14] oder 72 h [45] detektiert, lassen sich aber gegebenenfalls bereits nach 5 h abschätzen.

Hormonelle Wirkung

Seit Beginn der 90er Jahre wurde eine Fülle an Daten zusammengetragen, die zeigten, dass die Fortpflanzungsfähigkeit von Lebewesen durch Umweltsubstanzen stark beeinträchtigt werden kann, wenn diese in die von Geschlechtshormonen regulierten physiologischen Prozesse eingreifen, wie zum Beispiel die Regulation von Fruchtbarkeitszyklen oder die Entwicklung und Differenzierung der Geschlechtsorgane im Embryo. Standardisierte Testprotokolle der OECD auf hormonelle Wirkungen umfassen die Exposition von heranwachsenden genauso wie von trächtigen Tieren, wobei im letzteren Fall insbesondere die Nachkommen untersucht werden [5, 46, 47]. Relevante Parameter sind Größe, Differenzierungszustand und eventuelle Mißbildungen der Geschlechtsorgane, Zeitpunkt der Pubertät, Zyklusdauer, Hormonkonzentrationen und Spermienentwicklung [48].

Um den hohen Aufwand an Tieren und Zeit für Studien über mehrere Generationen zu reduzieren, sind alternative Testmethoden und Parameter von hoher Bedeutung. So wurde Vitellogenin (VTG) als Biomarker für östrogene Wirkungen etabliert. VTG ist ein großes Phosphoglycolipoprotein, dessen Synthese z. B. in Fischen unter hormoneller Kontrolle steht, da es als Vorläuferprotein der Eigelbproteine Phosvitin und Lipovitellin für die Entwicklung von Eizellen benötigt wird [49, 50]. Die Aktivierung des Östrogenrezeptors in der Leber durch Bindung von Liganden führt dementsprechend zur Induktion der VTG-Synthese, und VTG kann als Indikator für östrogene Wirkungen im Serum von Fischen nachgewiesen werden. Geeignete Nachweismethoden für VTG sind chromatographische oder elektrophoretische Trennungen von Serumproteingemischen [49, 51] oder aber Enzymimmunoassays, die direkt auf Serumproben angewandt werden können, wobei die für die Erkennung des VTG benötigten Antikörper jeweils das für eine Fischart spezifische Protein erkennen müssen [50, 52]. Alternativ wurde in *in vitro*-Tests mit Leberzellen auch die mRNA des VTG nachgewiesen [53, 54], wobei die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen bzw. Proben behandelt und anschließend auf Synthese der mRNAs verschiedener

Gene analysiert wurden (Transkriptomanalyse). Östrogen wirksame Substanzen führten zu einer Induktion sowohl der VTG - mRNA als auch der Östrogenrezeptor α - mRNA [54]. Mit diesen Untersuchungen ließen sich aktivierende Einflüsse von Substanzen von inhibierenden unterscheiden.

Einfacher durchführbar sind jedoch Tests, bei denen die Bindung an den Rezeptor nachgewiesen wird. Dies kann zum einen über molekulare Tests oder Tests mit Reporterorganismen erfolgen [25], zum anderen aber auch über das Wachstum der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7. Diese Zelllinie ist östrogenabhängig und besitzt in Gegenwart von 17β -Estradiol ihre maximale Wachstumsgeschwindigkeit. Andere Substanzen mit östrogenen Wirkung führen ebenfalls zu einem beschleunigten Wachstum (E – SCREEN Biotest) [55]. Im A – SCREEN Biotest wird die MCF-7-AR1-Zelllinie eingesetzt, die neben dem Östrogenrezeptor auch den Androgenrezeptor (AR) besitzt. Durch 17β -Estradiol werden die Zellen zum maximalen Wachstum stimuliert, das dann in Gegenwart androgener Substanzen inhibiert wird [56, 57]. In der Regel werden die Zellen für 5 Tage mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und die Zahl der Zellen indirekt über Anfärbung der Proteine mit Sulforhodamin B photometrisch bestimmt [55, 58]. Diese Tests lassen sich auch in 96er Zellkulturplatten durchführen und wurden nicht nur zur Charakterisierung der östrogenen oder androgenen Wirkung einzelner Chemikalien eingesetzt, sondern auch zur Untersuchung von Klärwerksausläufen [58] und Wasserwegen [55]. Durch GC-MS – Analytik und Immunassays wurde in den Proben die Anwesenheit von einzelnen Substanzen, von denen eine östrogene Wirkung bekannt war, bestätigt [55].

Neurotoxizität

Als neurotoxisch werden Verbindungen bezeichnet, die die normale Aktivität und Funktion des Nervensystems beeinflussen. Mögliche Angriffspunkte für schädigende Substanzen sind Grundfunktionen in den Nervenzellen (Neuronen) oder Prozesse, die die Kommunikation

zwischen Neuronen durch Neurotransmitter betreffen (Rezeptoren, Ionenkanäle, Synthese und Abbau von Neurotransmittern). Neurotoxische Effekte können sich mit Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Schweißausbrüchen, Muskelschwäche, -zittern, Atemnot, Krämpfen und Koma akut bemerkbar machen. In anderen Fällen treten die Symptome nicht sofort, sondern mit zeitlicher Verzögerung auf, was die Zuordnung von verursachenden Substanzen deutlich erschwert. Besondere Aufmerksamkeit wird seit einiger Zeit toxischen Effekten auf das sich entwickelnde Gehirn von Ungeborenen und Kindern gewidmet [11, 59]. So wurde beobachtet, dass der Nachwuchs von trächtigen Mäusen, die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ausgesetzt wurden, im hohen Maße Gehirntumoren entwickelte. Auch die Geburtenrate nahm ab, und es wurden Zusammenhänge zu einem beeinträchtigten Lernvermögen hergestellt [60].

Die große Vielfalt von Symptomen für neurotoxische Effekte (s.o.) kann derzeit nur über Tiermodelle erfasst werden, für die es eine Reihe von Hinweisen und Richtlinien gibt (z.B. OECD Test guideline 424: Neurotoxicity study in rodents) [61]. Dabei wird zunächst das Verhalten der exponierten Tiere untersucht (s. Abb. 1), zum Beispiel ihre Beweglichkeit, die Funktionsfähigkeit der Sinnesorgane (Auge, Ohr) oder das Lernverhalten bzw. Erinnerungsvermögen. Hinzu kommen Gewebe- und Organuntersuchungen, bei denen zum Beispiel Veränderungen in Größe, Gewicht und Struktur des Gehirns und Vitalität und Aktivität von Nervenzellen erfasst werden. Als letzte Stufe werden auch molekulare Untersuchungen durchgeführt, zu denen Untersuchungen auf eine *in vivo* Hemmung der Acetylcholinesterase, Proteinanalysen und Genexpressionsstudien gehören.

Wegen der Komplexität des Nervensystems und neurotoxischer Symptome ist auch die Etablierung von geeigneten Biomarkern relativ schwierig. Erfolgversprechend scheint die Anwendung von Markern für ausgewählte Substanzklassen oder schädigende Mechanismen zu sein. Beispiele dafür sind die *in vivo* Hemmung der Acetylcholinesterase, oder eine Zunahme des sauren Faserstrukturproteins aus Gliazellen (glial fibrillary acidic protein

GFAP). Die Acetylcholinesterase ist für den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin notwendig, und damit für die Regulation der Kommunikation zwischen Nervenzellen, so dass eine Hemmung direkt zu neurotoxischen Effekten führt. Dagegen ist eine erhöhte GFAP-Konzentration ein Indikator für eine verstärkte Aktivität von Astrozyten, die zum Beispiel ihre Ursache in einer Schädigung von Nervengewebe haben kann [62].

Der *in vitro* Acetylcholinesterase-Hemmtest ist der am häufigsten eingesetzte molekulare Test auf neurotoxische Effekte [25], da eine Reihe von Substanzen (Carbamate, Organophosphate) dieses Enzym direkt hemmen. Aber auch zellbasierte *in vitro* Tests mit Nervenzellkulturen sind möglich. Geeignete Testparameter sollten eine Unterscheidung zwischen generell zytotoxischen und spezifisch neurotoxischen Effekten zulassen. Dazu gehören zum Beispiel Veränderungen in der Morphologie der Zellen, wie der Struktur der Axone und Dendriten, aber auch in der Synthese von Neurotransmittern, sowie in der Funktion von Rezeptoren und Ionenkanälen [62, 63]. Durch Untersuchungen des Zytoskeletts oder von Proteinfunktionen oder – modifikationen können Schädigungen grundlegender Zellfunktionen erkannt werden [20, 33, 37].

Da sich Nervenzellen im Gegensatz zu anderen Zellen nur in sehr eingeschränktem Maße regenerieren, ist die Ursache für viele Symptome letzten Endes eine reduzierte Funktionalität und Lebensfähigkeit der Neuronen, die sich unter Umständen erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung durch Akkumulation von Schädigungen physiologisch bemerkbar macht. Zunehmend werden daher auch chronische Langzeiteffekte im Niedrig-Dosis-Bereich diskutiert, die derzeit ebenfalls nur durch gezielte Untersuchungen an Tiermodellen erfasst werden [10].

Immuntoxizität

Das Immunsystem dient dem Schutz eines Organismus vor eindringenden Fremdstoffen, wie Bakterien, Viren oder Krebszellen [64]. Es wird durch Substanzen aktiviert, die als

„fremd“ erkannt wurden, wobei es durch Ausschüttung von Signalstoffen (Zytokinen) zu einer regulierten Immunabwehr durch verschiedene Zelltypen kommt [64]. Schädigungen des Immunsystems können alle Aspekte dieser Immunabwehr von der ersten Erkennung der Fremdstoffe, über die intrazellulären Signalkaskaden zur Ausschüttung von Signalstoffen bis hin zur endgültigen Eliminierung der Fremdkörper betreffen. Sie können seine Aktivität vermindern, das heißt, eine verminderte Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen zur Folge haben, aber auch zu Überreaktionen, und damit zu Überempfindlichkeiten, Allergien oder Autoimmunkrankheiten führen. Immuntoxische Effekte treten häufig in Konzentrationsbereichen auf, die sonst noch nicht als toxisch betrachtet werden.

Derzeit werden Richtlinien zur zukünftig vorgeschriebenen Berücksichtigung immunogener und immuntoxischer Eigenschaften von Substanzen im Zusammenhang mit Chemikalien- und Arzneimittelzulassungen entwickelt. Hinweise auf ein immuntoxisches Potential können aus den Standard-Toxizitätsstudien gewonnen werden (28 Tage Test mit täglicher Dosierung in Nagetieren), indem im Blut die Zusammensetzung der Population der Zellen des Immunsystems, sowie der gebildeten Immunglobuline analysiert wird. Außerdem sind Veränderungen in Gewicht und Histologie von Organen des Immunsystems (z.B. Knochenmark, Lymphknoten, Milz) oder eine erhöhte Infektionsrate Hinweise auf entsprechende Schädigungen. Zusätzlich kann dann noch die Aktivität von Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Killerzellen, T-Zellen) geprüft werden [9, 65, 66]. In der Regel hat sich die Erfassung von 2-3 dieser Parameter in exponierten Mäusen oder Ratten für die Bewertung immuntoxischer Effekte als ausreichend erwiesen.

Immuntoxische Effekte lassen sich nicht nur in Säugetieren beobachten sondern auch bei aquatischen Lebewesen, auch wenn sich deren Immunsystem im Detail von dem der Säugetiere unterscheidet. Fische besitzen Zellen und Gewebe mit ähnlichen Funktionen wie die Lymphozyten oder Monozyten, so dass auch von ihnen selektive Antikörper, Interleukine und Zytokine als Antwort auf immunstimulierende Bedingungen gebildet werden [67].

Mit *in vitro*-Tests wurde bislang das immuntoxische Potential einzelner Substanzen, aber auch von Wasserproben, wie Trinkwasser oder Flusswasser, evaluiert, indem Zellen des Immunsystems *in vitro* durch Fremdkörper, wie Mikroorganismen und ihre Zellwandbestandteile, Viren, Proteine aber auch nicht-biologische Partikel, stimuliert werden. Die Zellen können unmittelbar aus dem Blut von Probanden oder Mäusen stammen [68], es können aber auch Makrophagen-Zelllinien verwendet werden. Die mit der Stimulation verbundene Synthese von Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin-1 β , Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor - α (TNF- α), ist über entsprechende Immunoassays detektierbar. Als neuer Ansatz wurde die Entwicklung eines „Cell Chips“ beschrieben, der auf Reporterzelllinien basierte, in denen die Aktivierung der Expression von Zytokinen mit der Synthese eines grün fluoreszierenden Proteins gekoppelt wurde. Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich in dem Zytokin, dessen Expression über die Fluoreszenz der Zellen verfolgt werden konnte [59, 70]. Mit verschiedenen als immunmodulatorisch bekannten Substanzen wurde die grundsätzliche Eignung des Prinzips gezeigt.

Als funktioneller *in vitro*-Test kann mit Leukozyten oder Makrophagen auch die Internalisierung von Fremdpartikeln durch Phagozytose anstelle der Synthese der Signalstoffe detektiert werden. Dazu können Fluorescein-markierte Bakterien mit den Immunzellen inkubiert werden. Nach der Inkubationszeit befinden sich einige Bakterien außerhalb, einige im Innern der Leukozyten. Durch Zugabe eines Fluoreszenz-Quenchers wird die Fluoreszenz der nicht-internalisierten Bakterien gelöscht, so dass das Fluoreszenzsignal mit der Anzahl der internalisierten Bakterien, d. h. mit der Phagozytoseaktivität steigt (www.orpegen.com). Derartige Tests sind im Bereich der Wasseranalytik bislang nicht vorgeschrieben.

Organtoxische Wirkungen

Die Leber ist das zentrale Organ für die Metabolisierung von Nähr- und Fremdstoffen, zu denen zum Beispiel Xenobiotika, aber auch Arzneimittel gehören [71], sowie für die

hormonell gesteuerte Synthese bzw. den Abbau von Speicherstoffen, wie Glykogen oder Vitellogenin (s.o.). Damit ist die Leber möglichen Schadstoffen in der Regel direkt ausgesetzt, so dass schädigende Einflüsse sich häufig schneller in der Leber als in anderen Organen bemerkbar machen, und Leberschäden zu negativen Konsequenzen für Wachstum und Gesundheit, aber gegebenenfalls auch Fortpflanzungsfähigkeit der Organismen führen. Daher werden organotoxische Untersuchungen vor allem an der Leber bzw. Leberzelllinien durchgeführt. Andere Organe, wie Nieren, Gehirn, Lunge, werden vor allem dann mit berücksichtigt, wenn entsprechende Schädigungen vermutet werden.

Histopathologische Untersuchungen der Gewebe bilden in allen Fällen den klassischen Ausgangspunkt der Untersuchungen [72], neben Bestimmungen von Größe und Gewicht des jeweiligen Organs.

Da eine wesentliche Aufgabe der Leber die Entgiftung des Organismus von Schadstoffen ist, wird auf molekularer Ebene vor allem die Induktion der entsprechenden Enzyme untersucht. Der erste Schritt dieser Entgiftungskaskade ist eine Oxidation oder Hydroxylierung der Substanzen (Phase I), auf die im zweiten Schritt eine Konjugation mit Sulfat- oder Glukuronsäureresten (Phase II) folgt [71]. Durch diese Reaktionen wird in der Regel die Polarität und damit die Wasserlöslichkeit der Substanzen erhöht, so dass sie leichter ausgeschieden werden können. Es hat sich jedoch gezeigt, dass für eine Reihe von Substanzen die aus den Phase I - Reaktionen entstandenen Produkte eine höhere Toxizität besitzen als die Ausgangsverbindungen. So besitzen von den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) die hydroxylierten Epoxid-Metabolite ein höheres Potential, mit der DNA kovalente Bindungen einzugehen als die Ausgangsverbindungen [73], vom Fungizid Vinclozolin sind kaum toxische Effekte bekannt, während die Metabolite anti-androgene Eigenschaften besitzen [74] und die als Insektizide verwendeten Thiophosphate zeigen erst als Oxoprodukte die neurotoxische Wirkung als Acetylcholinesterasehemmer. In einer Reihe von Protokollen für *in vitro* Tests ist daher eine metabolische Aktivierung der

Probe mit Lebermikrosomen vorgesehen, wobei im wesentlichen aktive Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) benötigt werden, die eine breite Substratspezifität besitzen, um die Vielzahl der verschiedenen Xenobiotika umsetzen zu können.

Eine Besonderheit der an Entgiftungsprozessen beteiligten Proteine ist die Tatsache, dass ihre Bildung erst durch die Anwesenheit der Xenobiotika induziert wird, sie vom Organismus also nur nach Bedarf gebildet werden. Dementsprechend ist die Aktivität dieser Enzyme auch ein Indikator für die Anwesenheit entsprechender Substanzen. An der Induktion der Proteinsynthese sind zytosolische Rezeptoren, wie der Dioxin- oder Ah-Rezeptor [73] und andere Xenobiotika-Rezeptoren [71], beteiligt, die durch die Bindung von Liganden aktiviert werden, in den Zellkern wandern und dort die Expression einer Reihe von Genen beeinflussen. An der Oxidation von Xenobiotika sind vor allem die bereits erwähnten CYPs beteiligt, so dass das xenobiotische Potential einer Probe über die Induktion dieser Enzyme in Leberzellen aus Säugetieren (z. B. Ratten [75], Menschen [76]) aber auch aus Fischen (z.B. Regenbogenforelle [77]) erfasst werden kann (Abb. 3). Dazu wird in den Zellen die mRNA (Agarose Gelelektrophorese mit Northern Blot) oder das Protein (Acrylamid-Gelelektrophorese mit Western Blot) entweder als *in vitro* Test nach Inkubation oder aber als Biomarker in der Leber exponierter Tiere nachgewiesen [75, 76]. Auch die enzymatische Aktivität des Proteins als 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) wird als Parameter verwendet, wobei das Enzymsubstrat 7 – Ethoxyresorufin direkt zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenz des gebildeten Resorufins bestimmt wird [75, 78]. Der Nachweis der Enzymaktivität ist einfacher durchzuführen als der Proteintest, hat aber den Nachteil, dass Inhibitoren des Enzyms zu falsch-negativen Ergebnissen führen können [76]. Diese Tests wurden sowohl zur Untersuchung der Effekte einzelner Substanzen auf den Dioxinrezeptor, als auch zum Nachweis Dioxin-ähnlicher Substanzen in kontaminierten Sedimenten und Wasser [77, 79] eingesetzt.

Neben den CYPs dienen auch die Aktivitäten verschiedener Transferasen (Sulfotransferasen oder Glucuronosyltransferasen), die zu den Phase II – Enzymen gehören, zu den Biomarkern für induzierte Entgiftungsreaktionen [71].

Diskussion

Tests, bei denen lebende Organismen mit der zu untersuchenden Probe behandelt werden, dienen im wesentlichen dazu, Aussagen über die biologische Wirkung einer Probe zu erhalten. Dabei können Testorganismen sehr unterschiedlicher Komplexität und analytische Parameter unterschiedlicher Aussagekraft verwendet werden. Tab. 1 gibt dazu eine Übersicht, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, sondern aus der in erster Linie deutlich werden soll, dass schon mit Mikroorganismen und Zellkulturen unterschiedliche Schädigungen bzw. Effekte auch auf physiologische Reaktionen detektiert werden können. So kann der Einfluss von Substanzen auf Zellwachstum, Zellmorphologie, Integrität von Zellkomponenten, aber auch auf Stoffwechselaktivität, Expression einzelner (oder aller) Gene, Synthese und Modifikation von Proteinen, Funktionalität von Signalkaskaden oder auf Metabolite in *in vitro* – Tests untersucht werden. Diese Endpunkte sind mehr oder weniger spezifische Indikatoren für den einer unerwünschten Wirkung zugrunde liegenden Mechanismus, wobei auch die Auswahl des Testorganismus die Aussagekraft des Testergebnisses beeinflusst. So führen Schädigungen zentraler zellulärer Komponenten, zum Beispiel Zerstörung der Zellmembran, DNA - Strangbrüche oder Oxidationen von Proteinen, in nahezu allen Fällen zu Funktionsverlusten und damit zu toxischen Effekten. Diese sind weitestgehend unabhängig vom Testorganismus und können daher selbst mit Mikroorganismen erfasst werden. Wird dagegen der Effekt auf das Wachstum eines Organismus untersucht, ist zu beachten, dass verschiedene Organismen unterschiedlich empfindlich auf Störungen ihrer intrazellulären molekularen Netzwerke reagieren.

Werden als Testorganismen gezielt solche ausgewählt, die eine auch physiologische Funktion repräsentieren, so zeigen Veränderungen an Biomolekülen (DNA- oder Protein - Schäden) oder Beeinträchtigungen des Wachstums nicht nur diese Wirkung an (z.B. Gentoxizität, oxidativer Stress, Toxizität), sondern lassen gleichzeitig einen negativen Effekt auf die entsprechende physiologische Funktion vermuten. Werden zum Beispiel Nervenzellen oder Zellen des Immunsystems (z.B. T-Zellen, Makrophagen) als Testorganismen verwendet, können beobachtete Schädigungen auch auf eine eingeschränkte Funktionalität des Nerven- bzw. Immunsystems hinweisen. Allerdings ist zu beachten, dass es hier keine strenge Kausalität gibt, insbesondere dann nicht, wenn nur ein einzelner Parameter untersucht wurde. Einzelne molekulare Veränderungen können möglicherweise von den Organismen repariert und so kompensiert werden, dass sie sich nicht in einem physiologischen Effekt äußern. Erst wenn größere Schäden auftreten oder Schwellenwerte überschritten werden, kann der Stress nicht mehr abgewehrt werden, so dass die Zellen ihren Zelltod einleiten oder aber unkontrolliert wachsen. Eine detailliertere molekulare Analyse aktivierter Stressabwehrreaktionen auf der Basis der Gesamtheit der neu gebildeten oder modifizierten Proteine und / oder Metabolite (Proteom- bzw. Metabolomanalytik) könnte genauere Aussagen über das Ausmaß der Schädigung und die zu erwartende physiologische Reaktion zulassen. Die Zusammenhänge zwischen molekularen Veränderungen und zellulären Reaktionen, die sich dann als komplexe physiologische Wirkungen (Tumorentstehung, Missbildungen, Neuro- oder Immuntoxizität) zeigen, sind bis jetzt jedoch noch nicht robust etabliert. Allerdings wird derzeit durch den Einsatz von analytischen Methoden der molekularen Biochemie, wie eine umfassende quantitative Genexpressions-, Protein- und Metabolitenanalytik (s. Teil III), zusammen mit den zunehmenden Kenntnissen über die Struktur und Regulation intrazellulärer Reaktionsnetzwerke („gläserne Zelle“) in der Toxikologie die Datenlage deutlich verbessert.

Anzustreben wäre, dass in Zukunft mit Hilfe von Chips, Arrays oder ähnlichen mehrdimensionalen Formaten auch komplexe physiologische Reaktionen abgebildet werden können. Bis dieses Ziel erreicht ist, sind für diese Untersuchungen in der Regel anstelle von Mikroorganismen und Zellkulturen Tiere als Testorganismen notwendig, da bei ihnen neben den Zellkultur-ähnlichen Tests auch Beobachtungen zum Verhalten, zur Größe, Vitalität und Fortpflanzungsfähigkeit (z.B. Zahl und Gesundheit der Nachkommen) möglich sind. Allerdings werden in der Regel die Untersuchungen auf einige wenige Parameter beschränkt, im einfachsten Fall auf die Überlebensrate der Tiere nach Exposition mit der Probe. Dies ist zum Beispiel beim Fischttest der Fall, der zur Erfassung der Fischtoxizität im Abwasserabgabengesetz vorgeschrieben ist, oder im Maustest, der immer noch der Standardtest auf toxische Microcystine ist.

Unabhängig vom Testorganismus und analysierten Parametern liefern alle organismischen Tests keine Aussage über die die beobachtete Wirkung verursachende Substanz. Deren Identifizierung ist aber in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung: 1. Nicht nur anthropogene Substanzen verursachen biologische Wirkungen in Testorganismen und können schädliche Einflüsse auf Menschen, Tiere und Pflanzen haben. Beispiele für Substanzen natürlichen Ursprungs, die ebenfalls zu unerwünschten Wirkungen führen, sind die bereits erwähnten Algengifte (Microcystine, Okadasäure, etc.), aber auch Phytohormone, d.h. von Pflanzen gebildete Substanzen mit hormoneller (z.B. östrogen) Wirkung. 2. Erst die Identifizierung der verursachenden Substanzen lässt Maßnahmen zu, die zur Reduktion der Konzentration oder zur Vermeidung der Exposition führen. 3. Zuordnungen von biologischen Wirkungen zu chemischen Substanzen sind die Grundlage von Risikobewertungen und Festlegungen von Grenzwerten. Dies ist im Zusammenhang mit der Entdeckung immer neuer Substanzen in z.T. extrem niedrigen Konzentrationen von besonderer Bedeutung. Daher sind Kombinationen von biologischen mit chemischen Informationen unerlässlich (Teil III), wobei bislang ein wesentliches Defizit bei der Verfügbarkeit geeigneter biologischer Tests liegt, da diese auf

komplexe Proben anzuwenden wären und die Analysenergebnisse nach kurzer Zeit vorliegen müssten. Auch hier könnten „chip-basierte“ Testformate für komplexe Endpunkte Fortschritte bringen.

Referenzen

- [1] Hrsg.: K.G. Steinhäuser, P.D. Hansen: *Biologische Testverfahren*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1992**
- [2] K. Fent: *Ökotoxikologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**
- [3]Hrsg.: U. Bilitewski, A.P.F. Turner: *Biosensors for Environmental Monitoring*, harwood academic publishers, Amsterdam, **2000**, ISBN: 90-5702-449-7
- [4] J. Ashby: Scientific issues associated with the validation of in vitro and in vivo methods for assessing endocrine disrupting chemicals, *Toxicol.*, **2002**, 181-182, 389 – 397
- [5] T.H. Hutchinson, D.B. Pickford: Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment, *Toxicol.*, **2002**, 181–182, 383 – 387
- [6] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló : Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, 549 – 562
- [7] Hrsg. AG “Gentoxizität”: Gentoxizitätsprüfung im aquatischen Bereich – Möglichkeiten und Perspektiven, *Vom Wasser*, **2002**, 99, 197 – 232
- [8] M.K. Selgrade: Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process, *Toxicol.*, **1999**, 133, 59-72
- [9] J.T. Zelikoff, A. Raymond, E. Carlson, Y. Li, J.R. Beaman, M. Anderson: Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean, *Toxicol. Lett.*, **2000**, 112-113, 325-331
- [10] G.A. Jamal, S. Hansen, P.O.O. Julu: Low level exposure to organophosphorus esters may cause neurotoxicity, *Toxicol.*, **2002**, 181–182, 23 – 33
- [11] T. Colborn: Neurodevelopment and endocrine disruption, *Environ. Health Perspect.*, **2004**, 112, 944 –949
- [12] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi: Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.*, **2004**, 567, 109 - 149

- [13] Y. Oda, S. Nakamura, I. Oki, T. Kato, H. Shinagawa: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, **1985**, *147*, 219 - 29
- [14] B.I. Escher, N. Bramaz, R.I.L. Eggen, M. Richter: In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3090 – 3100
- [15] Lexikon der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1999**
- [16] D. Ghosh, P. Chakraborty: Involvement of protein tyrosine kinases and phosphatases in uptake and intracellular replication of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes in mouse macrophages, *Biosci. Rep.*, **2002**, *22*, 395 - 405
- [17] A. Gomez-Mendikute, A. Exteberria, I. Olabarrieta, M.P. Cajaraville: Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene, *Marine Env. Res.*, **2002**, *54*, 431 – 36
- [18] Y. Yano, M. Sakon, J. Kambayashi, T. Kawasaki, T. Senda, K. Tanaka, F. Yamada, N. Shibata: Cytoskeletal reorganization of human platelets induced by the protein 1/2 A inhibitors okadaic acid and calyculin A, *Biochem. J.*, **1995**, *307*, 439 - 49
- [19] F. Leira, C. Alvarez, J.M. Vieites, M.R. Vieytes, L.M. Botana: Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay, *Toxicol. in vitro*, **2001**, *15*, 277 - 282
- [20] F. Leira, A.G. Cabado, M.R. Vieytes, Y. Roman, A. Alfonso, L.M. Botana, T. Yasumoto, C. Malaguti, G.P. Rossini: Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, *63*, 1979 – 1988
- [21] M.J. Twiner, P. Hess, M.Y. Bottein Dechraoui, T. McMahon, M.S. Samons, M. Satake, T. Yasumoto, J.S. Ramsdell, G.J. Doucette: Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines, *Toxicon*, **2005**, *45*, 891 – 900

- [22] F. Leira, C. Alvarez, A.G. Cabado, J.M. Vieites, M.R. Vieytes, L.M. Botana: Development of a F actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins, *Anal. Biochem.*, **2003**, *317*, 129 – 135
- [23] L. Canesi, A. Scarpato, M. Betti, C. Ciacci, C. Pruzzo, G. Gallo: Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signalling pathways involved in mussel immune defence, *Marine Env. Res.*, **2002**, *54*, 547 – 551
- [24] H. Fujiki, M. Suganuma: Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1999**, *125*, 150 – 5
- [25] U. Bilitewski für den FA “Biochemische Arbeitsmethoden”: Biochemische Methoden in der Wasseranalytik – Stand der Technik und Perspektiven, Teil I: Molekulare Tests, *Vom Wasser*, eingereicht
- [26] W. Chen, L. Song, D. Ou, N. Gan : Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR, *Environ. Toxicol.*, **2005**, *20*, 323 – 30
- [27] S. Imanishi, K.-i. Harada: Proteomics approach on microcystin binding proteins in mouse liver for investigation of microcystin toxicity, *Toxicon*, **2004**, *43*, 651 - 59
- [28] M. Matsuoka, H. Igarashi: Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *282*, 1120 – 1125
- [29] B.I. Giasson, D.M. Sampathu, C.A. Wilson, V. Vogelsberg-Ragaglia, W.E. Mushynski, V.M.Y. Lee: The environmental toxin arsenite induces tau hyperphosphorylation, *Biochem.*, **2002**, *41*, 15376 – 15387
- [30] V. Lecœur, E. Le Ferrec, M N´diaye, M. Le Vee, C. Gardyn, D. Gilot, O. Fardel : ERK-dependent induction of TNF α expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages, *FEBS Lett*, **2005**, *579*, 1904 – 1910

- [31] H. Chen, J. Kovar, S. Sissons, K. Cox, W. Matter, F. Chadwell, P. Luan, C.J. Vlahos, A. Schutz-Geschwender, D.M. Olive : A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy, *Anal. Biochem.*, **2005**, 338, 136 – 142
- [32] S.K.F. Wong: A 384-well cell-based phospho-ERK assay for dopamine D2 and D3 receptors, *Anal. Biochem.*, **2004**, 333, 265 - 272
- [33] N. Aykin-Burns, E.A. Franklin, N. Ercal: Effects of N-Acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells, *Arch. Contaminants Toxicol.*, **2005**, on-line
- [34] S. Radice, L. Marabini, M. Gervasoni, M. Ferrarsi, E. Chiesara: Adaptation to oxidative stress: effects of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line, *Toxicol.* **1998**, 129, 183 – 191
- [35] C.S. Li, K.Y. Wu, G.P. Chang-Chien, C.C. Chou: Analysis of oxidative DNA damage 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of exposures to persistent pollutants for marine mammals, *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 2455 – 60
- [36] P. Ghezzi, V. Sonetto: Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins, *Proteomics*, **2003**, 3, 1145 – 53
- [37] B.I. Giasson, H. Ischiropoulos, V.M.Y. Lee, J.Q. Trojanowski: The relationship between oxidative / nitrate stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Free Radi. Biol. Med.*, **2002**, 32, 1264 – 75
- [38] R. Popovtzer, T. Neufeld, D. Biran, E.Z. Ron, J. Rishpon, Y. Shacham-Diamand: Novel integrated electrochemical nano-biochip for toxicity detection in water, *Nan Lett.*, **2005**, 5, 1023 – 27
- [39] A.C. Vollmer, T.K. van Dyk: Stress responsive bacteria: Biosensors as environmental monitors, *Adv. Microb. Physiol.*, **2004**, 49, 131 – 174
- [40] M. la Farré, I Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló: Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid

chromatography – mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 938, 187 – 197

[41] K. Kümmerer, R. Alexy, J. Hüttig, A. Schöll: Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria, *Water Res.*, **2004**, 38, 2111 – 2116

[42] G. Fotakis, J.A. Timbrell: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.*, **2006**, 160, 171 – 7

[43] M.V. Berridge, A.S. Tan: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, 303, 474 – 82

[44] J.K. Wong, P.R. Kennedy, S.M. Belcher: Simplified serum- and steroid-free culture conditions for high-throughput viability analysis of primary cultures of cerebellar granule neurons, *J. Neurosci. Meth.*, **2001**, 110, 45 – 55

[45] P. Radix, M. Leonard, C. Papantoniou, G. Roman, E. Saouter, S. Gallotti-Schmitt, H. Thiébaud, P. Vasseur : Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **2000**, 47, 186 – 194

[46] T. Höfer, I. Gerner, U. Gundert-Remy, M. Liebsch, A. Schulte, H. Spielmann, R. Vogel, K. Wettig, Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation, *Arch Toxicol*, **2004**, 78, 549 – 564

[47] L. Earl Gray, J. Ostby, E. Monosson, W.R. Kelce: Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat, *Toxicol Environ. Health*, **1999**, 15, 48 – 64

[48] W.R. Kelce, E.M. Wilson: Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications, *J. Mol. Med.*, **1997**, 75, 198 – 207

- [49] J. Shao, G. Shi, J. Liu, G. Jiang: A rapid two-step chromatographic method for the quantitative determination of vitellogenin in fish plasma, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *378*, 615 – 620
- [50] B.M. Nilsen, K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, A. Goksoyr: Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *378*, 621 – 633
- [51] T.R. Rankouhi, J.T. Sanderson, I. van Holsteijn, C. van Leeuwen, A.D. Vethaak, M. van den Berg: Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants in fish primary hepatocytes: Comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*), *Toxicol. Sci.*, **2004**, *81*, 90 – 102
- [52] J.F. Asturiano, F. Romaguera, P. Aragón, J. Atienza, R. Puchades, A. Maquieira: Sandwich immunoassay for determination of vitellogenin in golden grey mullet (*Liza aurata*) serum as a field exposure biomarker, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *381*, 1152 – 1160
- [53] I. Lutz, W. Kloas: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding, *Sci. Total Environ.*, **1999**, *225*, 49 - 57
- [54] V. Bemanian, R. Male, A. Goksoyr: The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ER α -signalling pathways, *Comp. Hepatol.* **2004**, *3*:2
- [55] M. Villalobos, N. Olea, J. A. Brotons, M.F. Olea-Serrano, J. M. Ruiz de Almodovar, V. Pedraza: The E-Screen Assay: A Comparison of Different MCF7 Cell Stocks, *Environ. Health Persp.* **1995**, *103*, 844-850
- [56] W. Körner, A.M. Vinggaard, B. Terouanne, R. Ma, C. Wieloch, M. Schlumpf, C. Sultan, A.M. Soto: Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals, *Environ. Health Perspect*, **2004**, *112*, 695 – 702

- [57] A.M. Soto, J.M. Calabro, N.V. Prechtel, A.Y. Yau, E.F. Orlando, A. Daxenberger, A.S. Kolok, L.J. Guilette, B. le Bizec, I.G. Lange, C. Sonnenschein: Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA, *Environ. Health. Perspect.*, **2004**, *112*, 346 – 352
- [58] W. Körner, V. Hanf, W. Schuller, C. Kempfer, J. Metzger, H. Hagenmaier: Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents, *Sci. Total Environ.*, **1999**, *225*, 33 – 48
- [59] J. Harry, B. Kulig, M. Lotti, D. Ray, H. Tilson, G. Winnecke, Neurotoxicity risk assessment for human health: Principles and Approaches, *Environm. Health Criteria* *223*, **2001**, WHO Geneva, ISBN 92 4 157223 X, ISSN 0250-863X
- [60] D.D. Wormley, A. Ramesh, D.B. Hood: Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**, *197*, 49 - 65
- [61] F. Kamel, J.A. Hoppin, Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease, *Environ Health Perspect*, **2004**, *112*, 950 – 958
- [62] National Institute of Neurological Disorders and Stroke: Neurotoxicity Information Page www.ninds.nih.gov/disorders/neurotoxicity/neurotoxicity_pr.htm
- [63] T.J. O'Shaughnessy, S.A. Gray, J.J. Pancrazio, Cultured neuronal networks as environmental biosensors, *J. Appl. Toxicol.*, **2004**, *24*, 379 - 385
- [64] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M.J. Shlomchik, Immunobiology, Garland Sci. New York, **2005**
- [65] C.C.P.P.C. Michielsen, H. van Loveren, J.G. Vos: The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity, *Environ. Health Perspect.*, **1999**, *107*, 783 – 792
- [66] H. van Loveren, P.A. Sterenberg, J.G. Vos: Early detection of immunotoxicity: from animal studies to human biomonitoring, *Toxicol. Lett.*, **1995**, *77*, 73 – 80
- [67] J.T. Zelikoff: Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicol.*, **1998**, *129*, 63 – 71

- [68] G. Wichmann, C. Daegelmann, O. Herbarth, G. Strauch, K. Schirmer, J. Wöstemeyer, I. Lehmann: Inflammatory activity in river-water samples, *Environ. Toxicol.*, **2004**, *19*, 594 – 602
- [69] E. Ulleras et al. : Development of the “Cell Chip” : a new in vitro alternative technique for immunotoxicity testing, *Toxicology*, **2005**, *206*, 245 – 256
- [70] T. Ringerike et al.: Detection of immunotoxicity using T-cell based cytokine reporter cell lines („Cell Chip”), *Toxicology*, **2005**, *206*, 257 - 272
- [71] J. Sonoda, R.M. Evans, Biological function and mode of action of nuclear xenobiotic receptors, *Pure Appl. Chem.*, **2003**, *75*, 1733 - 42
- [72]A. Koehler, The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast, *Aquat. Toxicol.*, **2004**, *70*, 257 - 276
- [73]W.M. Baird, L.A. Hooven, B. Mahadevan: Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action, *Environ. Mol. Mutagen.*, **2005**, *45*, 106 - 114
- [74] P. Hrelia, C. Fimognari, F. Maffei, F. Vivagni, R. Mesirca, L. Pozzetti, M. Paolini, G.C. Forti: The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide vinclozolin, *Mutagen.*, **1996**, *11*, 445 - 453
- [75] G. Chen, N.J. Bunce: Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway, *Environ. Toxicol.*, **2004**, *19*, 480 – 489
- [76] M.-F. Yueh, M. Kawahara, J. Raucy: Cell-based high-throughput bioassays to assess induction and inhibition of CYP1A enzymes, *Toxicol. in vitro*, **2005**, *19*, 275 - 287
- [77] W. Brack, K. Schirmer: Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P450A-inducers in a contaminated sediment, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3062 – 3070

[78] G. Radenac, G. Couteur, B. Danis, Ph. Dubois, M. Warnau : Measurement of EROD activity : caution on spectral properties of standards used, *Mar. Biotechnol.*, **2004**, *6*, 307 – 311

[79] K. Schirmer, V.R. Dayeh, S. Bopp, S. Russold, N.C. Bols: Applying whole water samples to cell bioassays for detecting dioxin-like compounds at contaminated sites, *Toxicol.*, **2004**, *205*, 211-221

Testorganismus		Testbezeichnung	Erfasste Funktion	Unerwünschte Wirkung	Referenz
Mikroorganismen	<i>Vibrio fischeri</i>	Leucht-bakterientest	Metabolismus	Toxizität	DIN 83412-314
	<i>Pseudomonas putida</i>	Wachstumshemmtest	Wachstum	Toxizität	
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Algentest	Photosynthese	Toxizität	ISO 8692
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Umu-Test	DNA-Reparatur	Gentoxizität	ISO 13829
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Ames-Test	Mutationsrate	Gentoxizität	ISO/CD 16240
	<i>Escherichia coli</i>		Glutathion-Oxidation	Oxidativer Stress	[33, 34]
Zellkulturen		Mikrokerntest	Chromosomen	Gentoxizität	[7, 12]
		Comet Assay	DNA Fragmentierung	Gentoxizität	[7, 12]
	Fibroblasten-Zelllinie	MTT-Test	Mitochondrien	Zytotoxizität	[43, 44]
		Neutralrot-Aufnahme-Test	Endozytose	Zytotoxizität	[42]
	Östrogenabhängige Brustkrebszelllinie MCF-7	E-Screen	Wachstum	Östrogene Effekte	[55]
		A-Screen	Wachstum	Androgene Effekte	[56, 57]
	T-Zellen, Makrophagen		Zytokin-Expression	Immuntoxizität	[68 - 70]
	Makrophagen, Leukozyten	Phagotest	Phagozytose-Aktivität	Immuntoxizität	
	Leberzelllinie		Induktion von CYP	Lebertoxizität, metabol. Aktivierung	[75 – 77]
				Kinase-, Phosphatase-Aktivität	Organtoxizität
Nervenzelllinie		Aktivität von Synapsen	Neurotoxizität	[62, 63]	
		Zytoskelettstruktur	Zytotoxizität	[19, 22]	
Tiere	Daphnien	Daphnientest	Schwimmfähigkeit	Toxizität	DIN 38412-11
	Goldorfe	Fischttest	Mortalität	Toxizität	DIN 38412-13

	Mäuse / Ratten		Vitalität Verhalten Organe Biomarker	Toxizität Neurotoxizität Reproduktion Immuntoxizität	OECD Richtlinien [60, 62, 66, 67, 74]
--	----------------	--	---	---	--

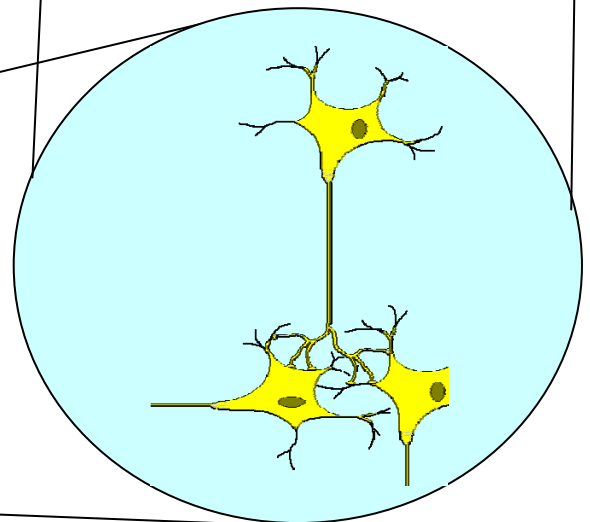
Untersuchung des Verhaltens und
physiologischer Reaktionen
(Lernverhalten, Muskelzittern, ..)



Organuntersuchung
(Größe und Struktur
des Gehirns, Integrität
von Zellkomponenten,
Zell-Zell-Kontakte, ...)

Molekulare Analyse
DNA-Schäden, Protein-Schäden
(*Oxidation, Aggregation, ..*),
Esterasehemmung,
Genexpression, Proteomanalytik,

Untersuchung der Zellen
(Morphologie und
Vitalität, Integrität von
Zellkomponenten,
neuronalen Aktivität)



**Ausschnitt aus einer
Nerven-Zellkultur**

Abb. 1: Vereinfachte Übersicht über Untersuchungsmöglichkeiten an Zellkulturen und Tieren am Beispiel von Effekten auf Nervenzellen (potentiell neurotoxische Effekte). Molekulare und zelluläre Untersuchungen sind in beiden Gruppen von Testorganismen möglich, komplexe physiologische Reaktionen können dagegen nur an Tieren getestet werden. Im Tier können auch Metabolite der Testsubstanz oder Auswirkungen auf andere Organe zu veränderten physiologischen Reaktionen beitragen (z.B. neuro-endokrine Wirkungen).

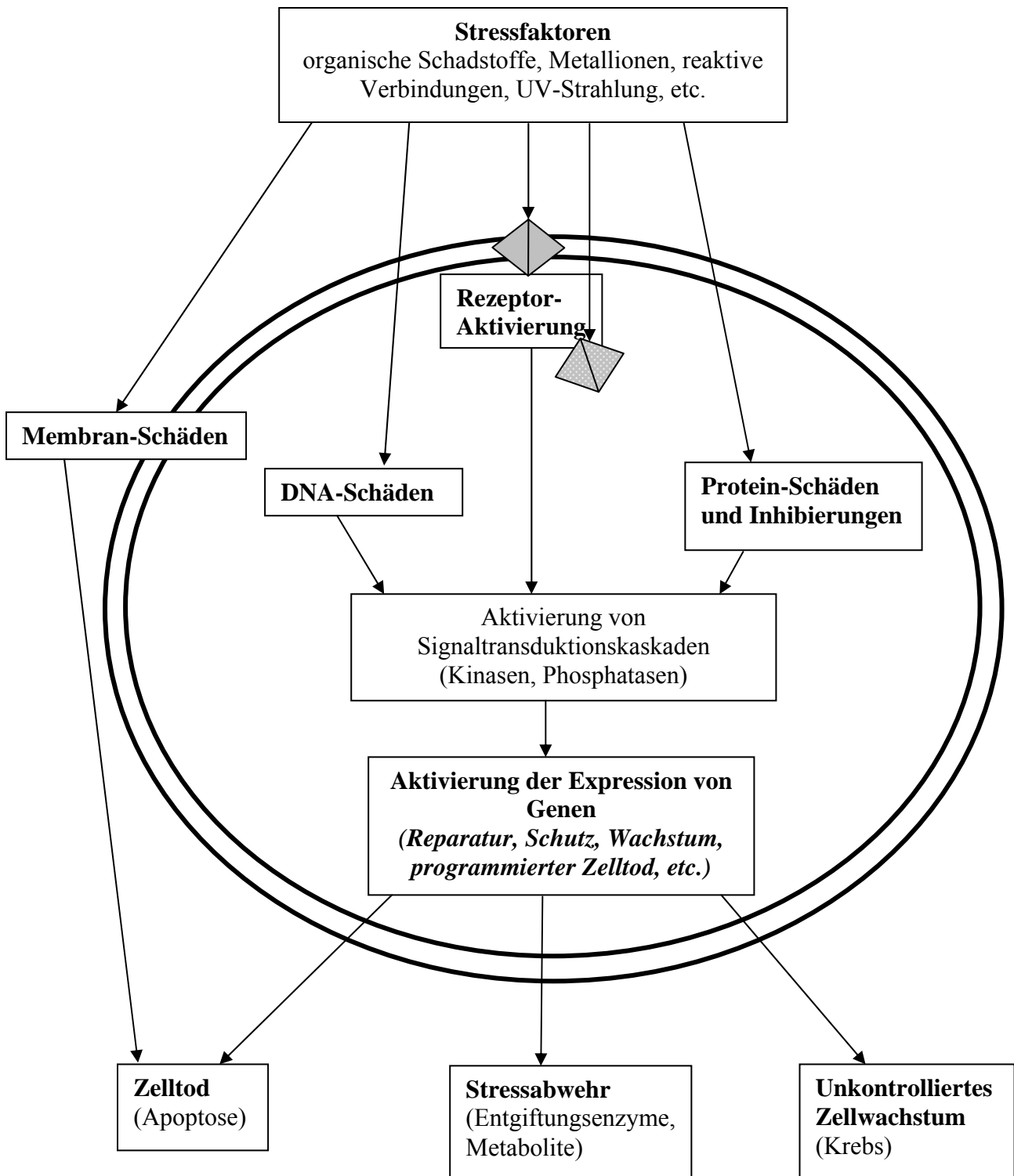


Abb. 2: Schematische Darstellung der durch Stressbedingungen ausgelösten intrazellulären Effekte. Die Relevanz der verschiedenen Angriffspunkte (Rezeptor, DNA, Proteine, Lipide, etc.) für die durch eine Probe hervorgerufenen Effekte lässt sich durch entsprechende Tests einzeln überprüfen (s. Text). Es können jedoch auch gemeinsame Endpunkte verschiedener Signaltransduktionskaskaden erfasst werden, wie z.B. die Aktivierung verschiedener mit unterschiedlichen Stressfaktoren assoziierter Kinasen oder Transkriptionsfaktoren. Eine weitere Stufe der Informationsintegration erhält man durch Untersuchungen auf summarische Parameter, wie Zellwachstum oder programmierten Zelltod (Apoptose), die für sich alleine keine Zuordnung zu einem spezifischen stressauslösenden Faktor mehr zulassen.

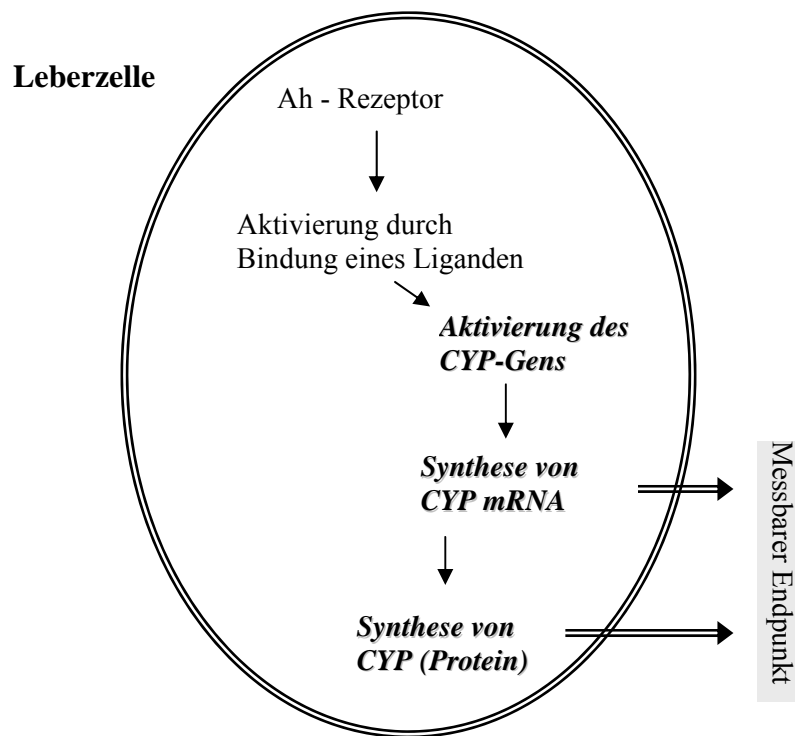


Abb. 3: Prinzip der Tests zum Nachweis der Dioxin (Ah) – Rezeptor-Aktivierung über die Aktivierung des Cytochrom P450 – Gens. Es kann die entsprechende mRNA, das Protein oder die enzymatische Aktivität des Proteins nachgewiesen werden.