

# Charakterisierung von Reaktivchemikalien anhand ihrer primären Wirkmechanismen

**Bilder von toten Fischen, die mit dem Bauch nach oben an das Ufer gespült werden, wer kennt sie nicht. Sie führen uns auf drastische Weise vor Augen, welche fatalen Auswirkungen Unfälle mit Chemikalien auf Lebewesen in Gewässern haben können. Unsere Umwelt wird jedoch auch durch geringe Chemikalienkonzentrationen kontinuierlich und leider meist unbemerkt beeinflusst. Deshalb ist es wichtig herauszufinden, wie genau Schadstoffe in Lebewesen reagieren. Ziel unserer Arbeit ist es, die verschiedenen primären Wirkmechanismen von Reaktivchemikalien mit Hilfe eines bakteriellen Testsystems zu erkennen, um so eine Risikoklassifizierung der Chemikalien vornehmen zu können.**

Das ökotoxikologische Risiko von Reaktivchemikalien kann mit klassischen Testmethoden nur unzureichend abgeschätzt werden. Dies liegt daran, dass Reaktivchemikalien oft schnell hydrolysieren und dass klassische Methoden meist nur einen Teil des breiten Wirkungsspektrums von Reaktivchemikalien erfassen. Die Erkennung des Wirkmechanismus ist jedoch gerade für Reaktivchemikalien von grosser Bedeutung, da der Wirkmechanismus entscheidend das Risikopotenzial bestimmt. Aus diesem Grund entwickeln wir derzeit ein umfassendes bakterielles Testsystem, das die verschiedensten Wirkmechanismen von Reaktivchemikalien abdecken soll.

## Schadstoffe schädigen Biomoleküle

Letztlich lassen sich alle toxischen Effekte zurückführen auf primäre Interaktionen der

Schadstoffe mit drei verschiedenen Klassen von Biomolekülen: Membranlipide, Proteine und die Erbsubstanz DNA [1]. Die Wechselwirkungen reichen von schwachen van-der-Waals-Wechselwirkungen über spezifische Wechselwirkungen, wie z.B. die Bildung von Wasserstoffbrücken oder gegenseitige Anziehung von Ladungen, bis hin zur Bildung chemischer Bindungen (Abb. 1). Schwache Wechselwirkungen führen in der Regel zu unspezifischen reversiblen Effekten und sind nur bei hydrophoben Umweltchemikalien relevant. Spezifische Wechselwirkungen werden z.B. bei Enzyminhibitionen beobachtet, wenn der Schadstoff wie ein Schlüssel ins Schloss passt und so das Enzym für das eigentliche Substrat versperrt. Unser spezielles Interesse jedoch gilt den Reaktivchemikalien, die mit den Biomolekülen am Zielort kovalente – meist irreversible – chemische Bindungen einge-

hen. Zu den Reaktivchemikalien zählt man eine grosse Anzahl von Substanzen mit verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen. Dazu gehören u.a. die reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Artikel von B. Fischer, S. 15) und die so genannten elektrophilen Chemikalien, auf die wir uns im vorliegenden Artikel konzentrieren.

## Die Zelle wappnet sich gegen Elektrophile

Elektrophile Chemikalien sind aufgrund ihrer Elektronenkonstellation elektronenarme Substanzen, die bevorzugt mit nukleophilen (= elektronenreichen) Gruppen in Peptiden, Proteinen oder DNA reagieren. Bevorzugte Ziele sind Thiolgruppen in Peptiden und Proteinen sowie gewisse Sauerstoff- und Stickstoffgruppen in der DNA (Abb. 2). Im ungünstigsten Fall werden Proteine durch Elektrophile so sehr geschädigt, dass sie ihre eigentlichen Funktionen nicht mehr ausüben können, während Reaktionen zwischen Elektrophilen und DNA zur Instabilität der DNA und zu Mutationen führen können, die schlimmstenfalls Krebs auslösen. Die Reaktionen an beiden Zielorten können bis zum Tod führen.

Doch die Zellen wappnen sich gegen solche Angriffe. Glutathion, ein intrazelluläres Tripeptid (Abb. 2), fängt elektrophile Schadstoffe ab, so dass sie anschliessend wieder aus der Zelle herausgeschleust werden können. Auch für DNA-Schäden gibt es eine

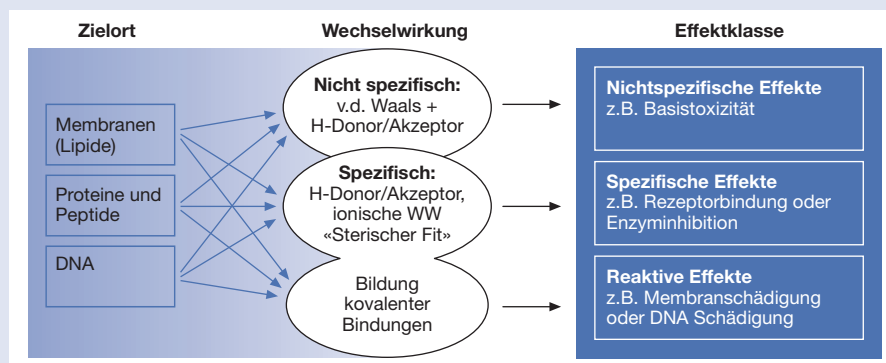


Abb. 1: Einteilung der toxischen Effekte nach Interaktionen der Schadstoffe mit Biomolekülen am Zielort.

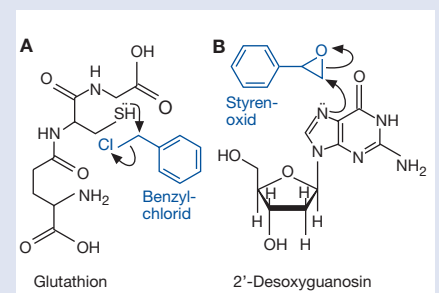


Abb. 2: Zwei Beispiele für primäre Wirkmechanismen reaktiver Umweltschadstoffe. Durch chemische Reaktionen mit Proteinen (A) oder DNA (B) kommt es zu toxischen Effekten.

Struktur	Geschädigte Biomoleküle	
<b>Epoxide</b>		
Styrenoxid	R = phenyl	DNA
2,3-Epoxypropylbenzen	R = benzyl	DNA
2-(4-Nitrophenyl)-Oxiran	R = p-nitrophenyl	DNA und Proteine
1,2-Epoxybutan	R = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	DNA
Epichlorhydrin	R = CH <sub>2</sub> Cl	DNA und Proteine
2-Methyl-2-Vinylloxiran		DNA und Proteine
<b>Reaktive Organochlorine</b>		
Benzylchlorid	R = H	DNA und Proteine
3-Methylbenzylchlorid	R = m-CH <sub>3</sub>	DNA und Proteine
4-Nitrobenzylchlorid	R = p-NO <sub>2</sub>	DNA und Proteine
2,3-Dichlor-1-propen		DNA und Proteine
trans-1,4-Dichlor-2-buten		DNA und Proteine
<b>Substanzen mit aktivierten Doppelbindungen</b>		
Acrolein	R = H	Proteine
Ethylacrylat	R = O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Proteine
2-Hydroxyethylacrylat	R = O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -OH	Proteine
Isobutylacrylat	R = HO-sec-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Proteine
Acrylnitril		Proteine
Acrylamid		Proteine

Tab. 1: Die 18 verwendeten Umweltschadstoffe und ihre primären Wirkmechanismen.

Vielfalt von Reparaturmechanismen, die Fehler in der DNA-Sequenz erkennen und reparieren. Bei hohen Schadstoffkonzentrationen und/oder längerer Exposition sind solche Verteidigungssysteme allerdings überfordert und es tritt ein toxischer Effekt auf.

### Evaluierung verschiedenster *E.-coli*-Mutanten und Effektparameter

Methoden, die die Aktivität dieser Verteidigungssysteme anzeigen, eignen sich also

besonders gut als Testsysteme zur Identifizierung der primären Wirkmechanismen von Elektrophilen. Man muss allerdings berücksichtigen, dass die Toxizität einer elektrophilen Substanz nicht nur durch ihre chemische Reaktivität sondern auch durch die Konzentration der Substanz am intrazellulären Wirkort bestimmt wird. Die Konzentration am Wirkort wiederum ist abhängig davon, wie viele Moleküle der elektrophilen Substanz überhaupt in den Organismus aufgenommen werden, wie der Schadstoff innerhalb des Organismus verteilt wird und

ob der Organismus es schafft, den Schadstoff rasch in ein weniger schädliches Produkt umzuwandeln. Diese Prozesse haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des jeweiligen Schadstoffs. Bei einem einzelligen Organismus kann man jedoch davon ausgehen, dass im Fall von hydrophilen Substanzen die Schadstoffkonzentration am Wirkort genauso hoch ist wie die extrazellulär herrschende Schadstoffkonzentration. Wir haben daher mit dem Bakterium *Escherichia coli* gearbeitet. Dies war auch deshalb von Vorteil, weil zahlreiche Mutanten von *E. coli* verfügbar sind. Insgesamt wurde eine breite Palette verschiedener *E.-coli*-Stämme evaluiert. Dabei wurden 17 unterschiedlich wirkende elektrophile Substanzen (Tab. 1) getestet und folgende Effektparameter gemessen: die Wachstumsinhibition, die intrazelluläre Glutathionkonzentration, das Auftreten von DNA-Strangbrüchen und die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen [2].

### Zwei *E.-coli*-Stammpaare als Biosensoren

Als besonders erfolgreich hat sich die Verwendung von zwei *E.-coli*-Stammpaaren herausgestellt. Die Stämme MJF276 (Glutathion<sup>+</sup>) und MJF335 (Glutathion<sup>-</sup>) unterscheiden sich lediglich in ihrer Fähigkeit, Glutathion zu synthetisieren, sind aber ansonsten genetisch identisch. Auch das zweite Stammpaar ist, bis auf die Fähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren, genetisch identisch: in MV4108 (DNA<sup>-</sup>) sind mehrere Gene mutiert, die für DNA-Reparaturenzyme kodieren, wogegen dieselben Gene in MV1161 (DNA<sup>+</sup>) intakt sind.

Flüssigkulturen dieser Stammpaare wurden mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden elektrophilen Substanzen versetzt. Anschliessend wurde die Wachstumsinhibition gemessen. Dabei zeigte sich, dass solche Reaktivchemikalien, die auf Proteinebene angreifen, deutliche Wachstumsunterschiede zwischen dem Gluta-

thion<sup>+</sup>- und dem Glutathion<sup>-</sup>-Stamm erzeugten, wogegen das Wachstum des DNA<sup>+</sup>- und des DNA<sup>-</sup>-Stamms nicht verändert war (Abb. 3A). Zu dieser Chemikalien-Gruppe gehören die sechs untersuchten Substanzen mit aktivierter Doppelbindung (Tab. 1). Dagegen induzierten jene Reaktivchemikalien, die auf eine Schädigung der DNA abzielen, deutliche Wachstumsunterschiede beim DNA<sup>+</sup>/DNA<sup>-</sup>-Stammpaar, wobei das Wachstum des DNA<sup>-</sup>-Stamms, im Gegensatz zum DNA<sup>+</sup>-Stamm, eindeutig inhibiert wird (Abb. 3B). Diese Substanzen, zu denen drei der untersuchten Epoxide gehören (Tab. 1), erzeugten jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Glutathion<sup>+</sup>- und dem Glutathion<sup>-</sup>-Stamm. Ausserdem konnten wir eine dritte Gruppe von Substanzen als unspezifisch reaktiv identifizieren, weil sie sowohl auf Proteine wie auch auf DNA-Ebene angreifen (Tab. 1) und Wachstumsunterschiede innerhalb beider Stammpaare hervorriefen (Abb. 3C).

## Validierung und Weiterentwicklung des Testsystems

Die Resultate dieser Studie eignen sich nicht nur für eine Klassifizierung der Wirkmechanismen, sondern auch für die Beschreibung von Effekten in aquatischen Organismen. Dies wird deutlich, wenn man die EC<sub>50</sub>-Werte der an *E. coli* untersuchten Substanzen gegen EC<sub>50</sub>-Werte aufträgt, die aus Experimenten an aquatischen Organismen stammen. Es zeigt sich, dass eine lineare Korrelation zwischen den verschiedenen EC<sub>50</sub>-Werten besteht (Abb. 4). Als EC<sub>50</sub>-Wert wird diejenige Konzentration eines Schadstoffs bezeichnet, bei der ein 50%iger Effekt auftritt – in unserem Fall Wachstumsinhibition bei *E. coli* und Algen sowie Letalität bei Wasserflöhen und Fischen.

Die beschriebene Studie ist erst ein Anfang in der Bewertung von Reaktivchemikalien anhand ihres primären Wirkmechanismus. Einerseits sollen die vorgestellten Stammpaare in ökotoxikologischen Testbatterien

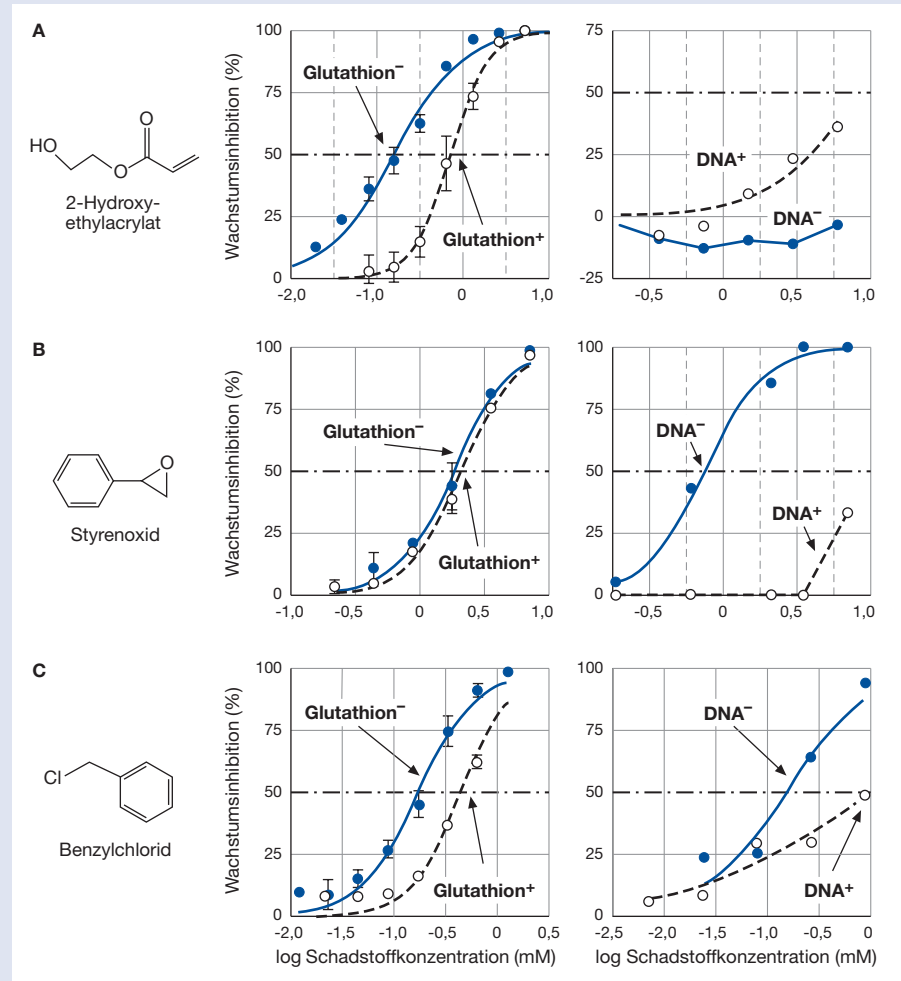


Abb. 3: Wachstumskurven der beiden *E. coli*-Stammpaare Glutathion<sup>+</sup>/Glutathion<sup>-</sup> und DNA<sup>+</sup>/DNA<sup>-</sup> bei verschiedenen Schadstoffkonzentrationen.  
**A:** 2-Hydroxyethylacrylat als Beispiel eines Protein schädigenden Schadstoffs,  
**B:** Styrenoxid als Beispiel eines DNA-schädigenden Schadstoffs und  
**C:** Benzylchlorid als Beispiel eines unspezifisch reaktiven Schadstoffs, der sowohl mit Proteinen als auch mit DNA reagiert.

Anwendung finden, andererseits sollen die Konzepte weiterentwickelt und auf andere Wirkmechanismen ausgedehnt werden. Eine differenzierte ökotoxikologische Risikobewertung ist jedoch erst möglich, wenn es ausserdem gelingt, die Kausalkette zu schliessen zwischen den primären Interaktionen auf molekularer Ebene und den beobachtbaren Effekten auf Populations- oder Ökosystemebene.



**Beate Escher, Chemikerin und Leiterin der Arbeitsgruppe «Wirkmechanismus-orientierte Chemikalienbewertung» in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie».** Privatdozentin für Umweltchemie und Ökotoxikologie an der ETH Zürich. **Forschungsthemen:** Aufnahme und Verteilung von Chemikalien in Organismen, toxische Wirkmechanismen, Methoden der Chemikalienbewertung.

**Koautoren:** Angela Harder, Paolo Landini, Christian Niederer, Nicole Tobler

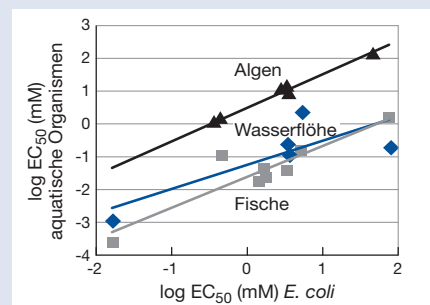


Abb. 4: Toxizitätsdaten (EC<sub>50</sub>-Werte) der untersuchten Schadstoffe. EC<sub>50</sub>-Werte für *E. coli* werden mit EC<sub>50</sub>-Werten für Algen, Wasserflöhe und Fische verglichen.

- [1] Escher B.I., Hermens J.L.M. (2002): Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology* 36, 4201–4217.  
 [2] Harder A. (2002): Assessment of the risk potential of reactive chemicals with multiple modes of toxic action. Dissertation ETH Zurich, 78 p.