

Internationaler Workshop ‚Wirkungsbezogene Analytik‘
Berlin, 18.10.2012

Rezeptor-vermittelte Effekte

Dieter Schrenk

Lebensmittelchemie und Toxikologie

Technische Universität Kaiserslautern

2012

Thesen:

1. Ein ideales Risk assessment basiert auf dem Verständnis des Wirkmechanismus einer Substanz (Mode of action, MOA)
2. Rezeptor-vermittelte Wirkmechanismen zählen zu den am besten untersuchten, toxikologisch relevanten MOAs
3. Rezeptor-vermittelte MOAs sind oft sehr empfindlich und mehr oder weniger selektiv. Sie reagieren auf meist gut definierbare chemische Strukturmerkmale
4. Hohe Empfindlichkeit und Selektivität kann für MOA-assozierte Parameter (readouts) zur quantitativen Gruppenanalyse von Agonisten verwendet werden
5. Diese haben eine wirkungsrelevante Komponente (im Gegensatz zur chemischen Analytik)

Die am besten untersuchten Beispiele für die Anwendung rezeptor-vermittelter Effekte zur wirkungsbezogenen Analytik sind

Estrogen Rezeptor(en) ER

Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR)

Für weitere, toxikologisch relevante 'X Rezeptoren' (endogener Ligand nicht endgültig geklärt) sind ebenfalls screening Methoden entwickelt worden.

PXR (Pregnane X receptor)

LXR (Liver X receptor)

FXR (Farnesoid X receptor)

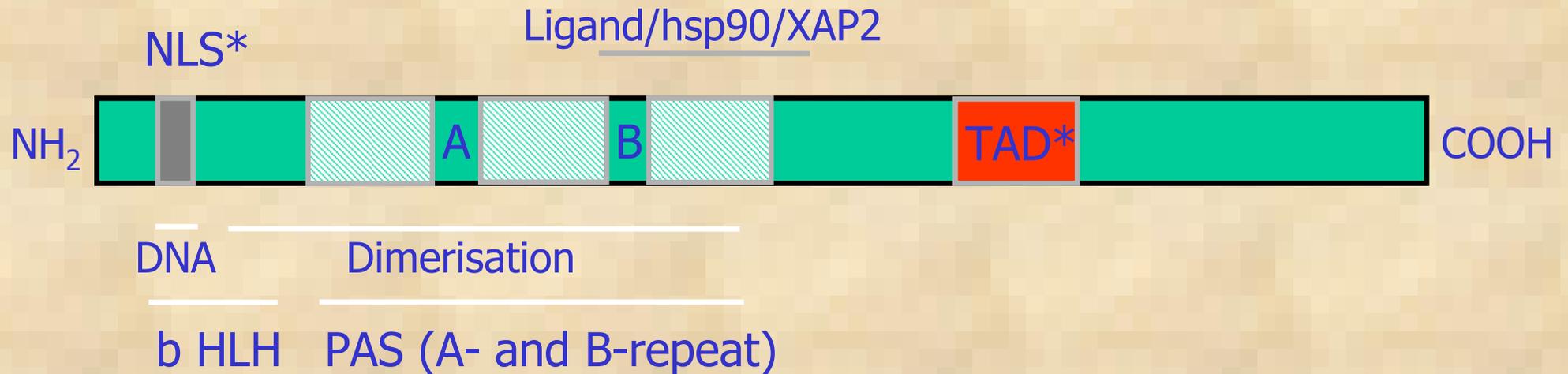
Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α , γ , δ)

'X-Rezeptoren'

	Selektivität	Endogene Liganden	Exogene Liganden	reg. Funktion
AhR	+++		PCDD/F DL-PCB PAK	Fremdstoffmetabolismus Immunsystem Zellproliferation..
CAR	+	Androstansterioide 5 β -Pregnandion Retinsäuren	Phenobarbital DL-PCB Aldrin, Dieldrin PBDEs, o,p'-DDT	Fremdstoffmetabolismus Energiehaushalt
PXR	+	5 α -Pregnandion, Progesteron u.a.	Hexabromcyclododecan Dexamethason Taxol, Bisphenol A, Diethylhexylphthalat, Nonylphenol	Fremdstoffmetabolismus Cholesterol/Gallensäure- Metabolismus
PPARs	++	α : Eicosanoide, Leukotrien B ₄ , (8S)- hydroxyeicosatetraensäure, oxid. Phospholipide, Carbaprostacyclin, unges. FS γ : 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J ₂	α : Diethylhexylphthalat, Fibrate γ : Indomethacin, Methylethylhexylphthalat, Diethylhexylphthalat,	α : FS-Oxidation, Ketogenese, Lipidtransport, Gluconeogenese, Glycogenmatabolismus, Entzündung γ : Adipocytendifferenzierung, Makrophagenfunktion
LXR	++	22(R)-Hydroxycholesterol, 20(S)- Hydroxycholesterol, 24(S),25- Epoxycholesterol	Paxilin (Pilzmetabolit)	Cholesterol- und FS-Homöostase
FXR	++	Gallensäuren	?	Gallensäuren-, FS-, Glucose- haushalt

Molekulare Aspekte

All potent PCDDs/Fs and ‚dioxinlike‘ PCBs bind the arylhydrocarbon (Ah) or Dioxin receptor (AhR)**, a member of the bHLH-PAS-family

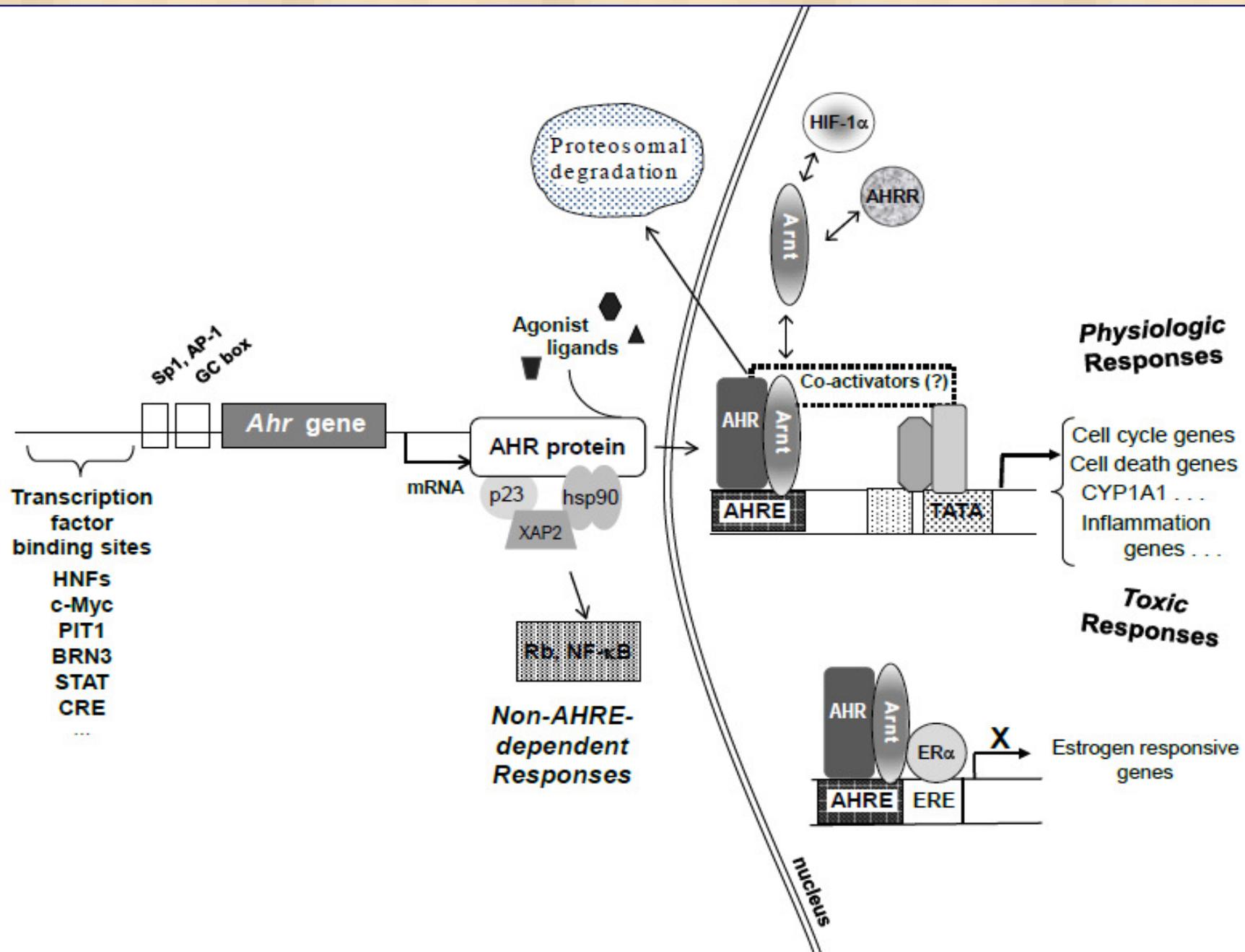


Human: 848 AA, 96 kDa; 11 Exons, Chromosome 7p15

*NLS = nuclear localization signal

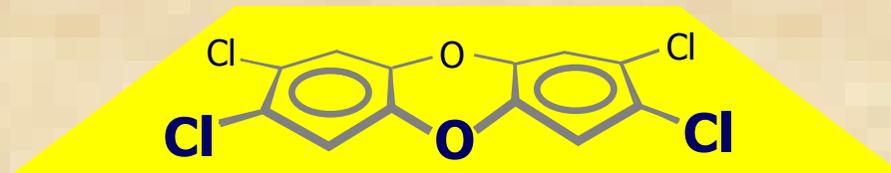
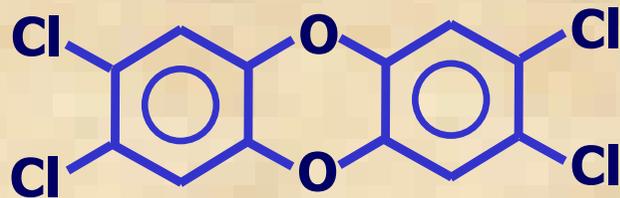
*TAD = Transactivation domain

Case study: Molecular events



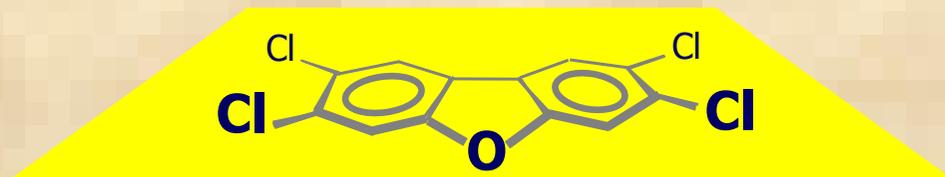
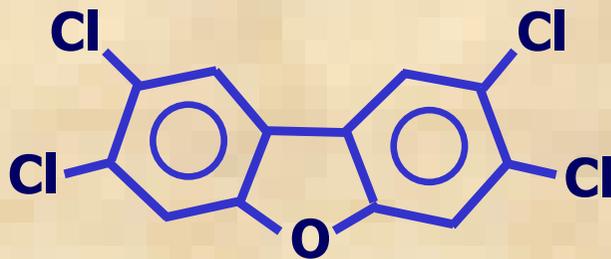
DL-Verbindungen

polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs):



2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

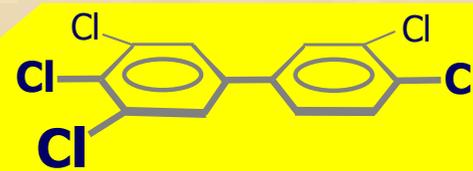
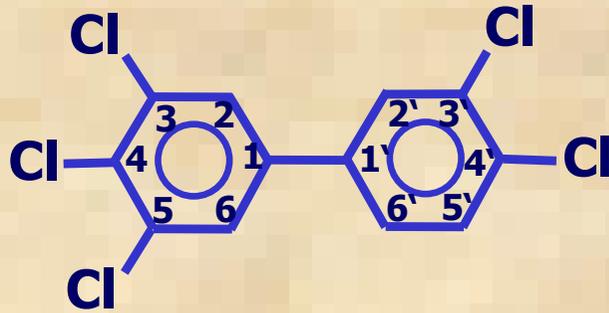
polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs):



2,3,7,8-Tetrachlordibenzofuran (TCDF)

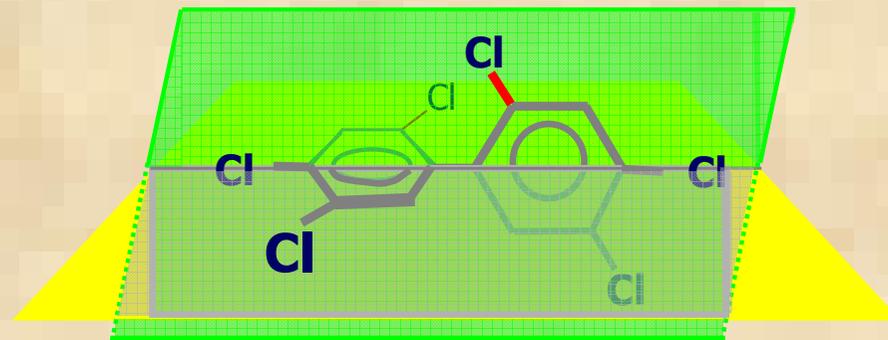
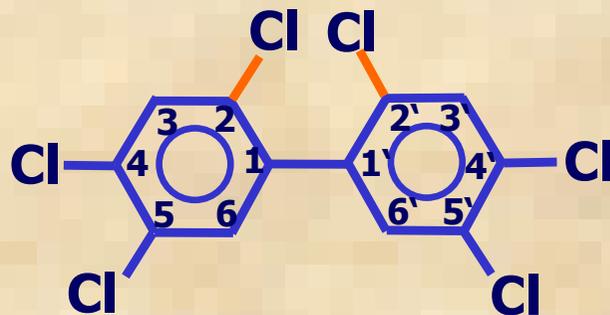
DL-Verbindungen

ein ‚dioxinähnliches‘ PCB-Kongener:



3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126)

ein ‚nicht - dioxinähnliches‘ PCB-Kongener:



2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153)

DL-Verbindungen

WHO-TEF (TCDD-Äquivalenzfaktoren) für die Risikobewertung beim Menschen (van den Berg et al., 2006)

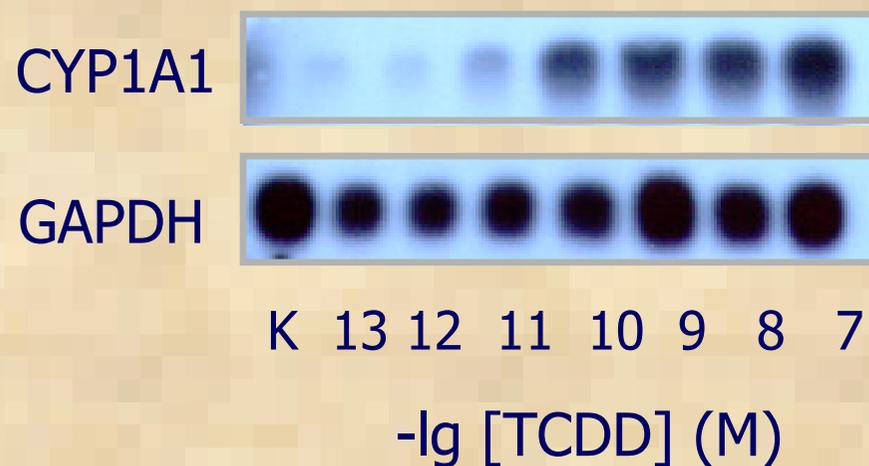
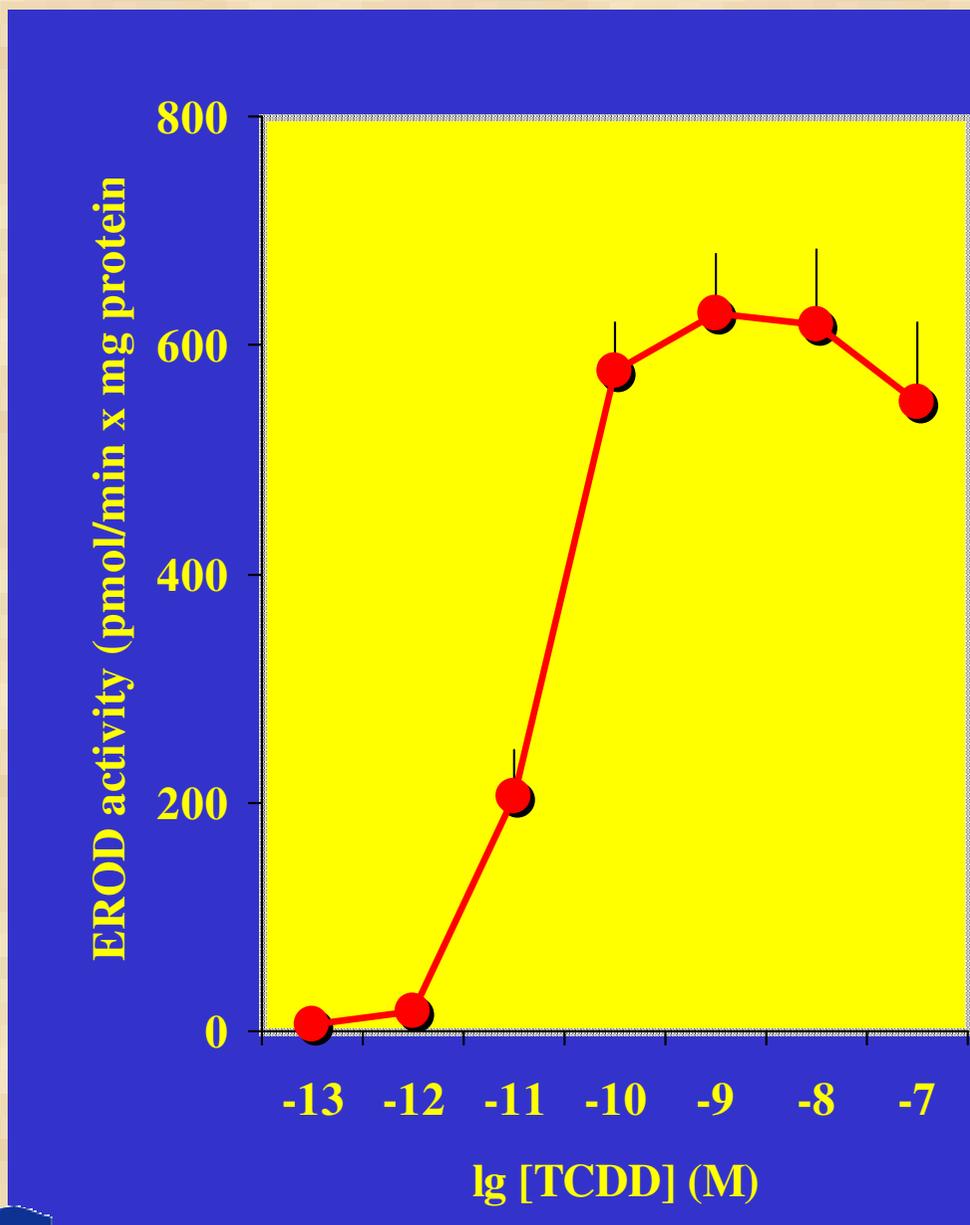
Kongener	TEF	Kongener	TEF
<i>Dibenzo-p-dioxine</i>		<i>Non-ortho PCB</i>	
2,3,7,8-TCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,7,8-PnCDD	1	PCB 81	0,0003
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	<i>Mono-ortho PCB</i>	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,0003
		PCB 114	66
<i>Dibenzofurane</i>		PCB 118	66
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 123	66
1,2,3,7,8-PnCDF	0,03	PCB 156	66
2,3,4,7,8-PnCDF	0,3	PCB 157	66
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	66
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	66
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1		
2,3,4,6,7,8-HxCDD	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Readouts der AhR-Aktivierung

- 1. Bindung an den Rezeptor (z.B. Verdrängungsassay mit radioakt. TCDD)**
- 2. Bindung des AhR an die Konsensussequenz der DNA (z.B. Gel-Mobility-Shift-Assay)**
- 3. Induktion der CYP1A1 mRNA**
- 4. Induktion eines CYP1A1-Reportergens**
- 5. Induktion des CYP1A1-Proteins**
- 6. Induktion der katalytischen CYP1A-Aktivität (z.B. EROD-Assay)**

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Induktion von CYP1A1 und der EROD*-Aktivität durch TCDD



CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Forderungen an einen 'Global-Assay' auf DL-Verbindungen:

1. **Spezifität (ist nur gegeben, falls die AhR-aktiven non-PCDD/F, DL-PCB vor dem Assay abgetrennt werden können).**
2. **Additivität (ist im Wesentlichen gegeben; Lipp et al., 1994, Schmitz et al., 1996)**
3. **Sensitivität (ist gegeben bei Anwendung von empfindlichen Säugerzellen)**
4. **Richtigkeit? Präzision?**

Wie präzise soll es sein? Was soll erfasst werden?

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Präzision/Richtigkeit?

Frage 1: Verlaufen die Konzentrations-Wirkungskurven für die Einzelverbindungen parallel?

Antwort: oft nicht der Fall

EROD-Induktion in H4IIE-Zellen

Sorry, unveröffentlichte Daten

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Präzision/Richtigkeit?

Frage 2: Sind die Maxima der Induktionskurven identisch?

Antwort: oft nicht der Fall

EROD-Induktion in H4IIE-Zellen

Sorry, unveröffentlichte Daten

EROD-Induktion in H4IIE-Zellen

Sorry, unveröffentlichte Daten

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Präzision/Richtigkeit?

Frage 3: Sind die Induktionsdaten (Relative Potencies; REPs) für die TEFs repräsentativ?

Antwort: nicht immer

REPs - EROD H4IIE cells - the thirteen

Sorry, unveröffentlichte Daten

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Präzision/Richtigkeit?

Frage 4: Sind die Induktionsdaten (Relative Potencies; REPs) für TEFs in verschiedenen Leberzell-Typen der Ratte unterschiedlich?

Antwort: in einigen Fällen ja

EROD-Induktion in prim. Rattenhepatozyten

Sorry, unveröffentlichte Daten

EROD-Induktion in prim. Rattenhepatozyten

Sorry, unveröffentlichte Daten

REPs - EROD H4IIE cells vs. primary rat hepatocytes (PH)
- the thirteen

Sorry, unveröffentlichte Daten

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Präzision/Richtigkeit?

Frage 5: Sind die REPs für Hepatozyten unterschiedlicher Spezies (Relative Potencies; REPs) identisch?

Antwort: in einigen Fällen nein

Sorry, unveröffentlichte Daten

CYP1A1 Induktion mit DL-Verbindungen

Schlussfolgerungen

- **Entscheidend ist die Frage, welche Anforderungen an einen AhR-selektiven Bioassay gerichtet werden (sollte als erstes geklärt werden!)**
- **AhR-basierte Zellkultur-Assays sind zu evaluieren und sind vermutlich als Screening-Methode wissenschaftlich geeignet wenn die Probenvorbereitung und Durchführung streng standardisiert wird.**
- **Die Induktionskurven zeigen nicht alle einen 'idealen' Verlauf, was in der Pharmako-/Toxikodynamik üblich ist**
- **Die Ergebnisse geben eine Grössenordnung des Gehaltes an TEQ wider. Eine Präzision der quantitativen Analyse wie bei der GC-MS/MS erscheint fraglich.**

Dank

TU Kaiserslautern

Alexander Cartus

Martin Chopra

Monika Gross

Christiane Lohr

Karl-Heinz Merz

Anastasia Messer

Sylke Naser

Hans-Joachim Schmitz

Thomas Seibel

Luckas Weishaupt

DKFZ Heidelberg

Christiane Opitz

Michael Platten

EU FP 7 ‚SYS-TEQ‘

DFG

**Stiftung Innovation,
Rheinland-Pfalz**

**Dow Chemicals,
Wilmington, USA**

Thank you for your attention!

