

Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung

In vitro Untersuchungen zellulärer Effekte nach Exposition mit
polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und endokrinen
Disruptoren mittels Metabolomanalysen:

Identifizierung von Biomarkern für die Risikobewertung und Einblick in
toxikologisch relevante Stoffwechselwege in HaCaT und MCF-7 Zellen



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sarah Potratz

aus Uslar

Berlin 2017

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2012 bis März 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Luch am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Luch (Freie Universität Berlin)

2. Gutachterin: Prof. Dr. Maria Kristina Parr (Freie Universität Berlin)

Tag der Disputation: 21.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Metabolomics in der Toxikologie	1
1.1.1. Methodik	1
1.1.2. Anwendungsmöglichkeiten	4
1.2. Verbrauchernahe Chemikalien.....	6
1.2.1. PAKs	6
1.2.2. Endokrine Disruptoren.....	10
2. Zielstellung.....	14
3. Ergebnisse	17
3.1. Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[<i>a</i>]pyrene and dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene.....	17
3.2. Combination of metabolomics with cellular assays reveals new biomarkers and mechanistic insights on xenoestrogenic exposures in MCF-7 cells	37
3.3. Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[<i>a</i>]pyrene and cadmium: the toxicological cascade biomarker approach.....	66
4. Diskussion.....	86
4.1. Differentielle Veränderungen zellulärer Metabolite in HaCaT Zellen nach Exposition mit drei karzinogenen PAKs: CRY, BAP und DALP	86
4.1.1. PAK-Einfluss auf Viabilität und CYP-Expression in HaCaT Zellen.....	86
4.1.2. Eingriff in biochemische Stoffwechselwege	88
4.1.3. Schlussfolgerung.....	90
4.2. Identifizierung von Biomarkern und mechanistische Einblicke nach Exposition mit Xenoestrogenen durch eine Kombination von Metabolomanalysen und zellulären Assays in MCF-7 Zellen	91
4.2.1. Ko-Exposition von BPA oder E2 mit dem Schwermetall Cd ²⁺	92
4.2.2. Mechanistische Untersuchung des estrogenen Biomarkers Pro	93
4.2.3. Schlussfolgerung.....	96
4.3. Identifizierung von Lipidbiomarkern für die Ko-Exposition subtoxischer Dosen von BAP und Cd ²⁺ : der toxikologische „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“	97
4.3.1. Ko-Exposition von BAP und Cd ²⁺	97

4.3.2. „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“	100
4.3.3. Schlussfolgerung.....	101
5. Übergreifende Interpretation und Ausblick	102
6. Zusammenfassung.....	106
7. Summary	108
8. Abkürzungsverzeichnis.....	110
9. Abbildungsverzeichnis.....	114
10. Literaturverzeichnis	115
11. Publikationsliste	126
11.1. Publikationen in Peer-Review Fachzeitschriften	126
11.2. Konferenzbeiträge.....	127

1. Einleitung

1.1. Metabolomics in der Toxikologie

Der Verbraucher ist im alltäglichen Leben einer Vielzahl von Chemikalien ausgesetzt. In der klassischen Toxikologie ist es üblich, Einzelsubstanzen in hohen Dosen in Tiermodellen zu testen, um mithilfe von Sicherheitsfaktoren unbedenkliche Aufnahmemengen für den Menschen zu ermitteln. In der modernen Toxikologie wird es immer wichtiger auch sogenannte Mischungseffekte zu adressieren und hierbei geringere Dosen der Einzelsubstanzen, die der tatsächlichen Aufnahmemenge näher kommen, zu betrachten (Tralau et al., 2015). Da außerdem zunehmend nach dem 3-R-Prinzip (*refine, reduce, replace*) tierversuchsfreie Methoden zur Substanztestung gefordert sind, rückt die Entwicklung von *in vitro* Methoden weiter in den Fokus (Marone et al., 2014). Auch wenn die Etablierung von aussagekräftigen Zellkulturmodellen eine große Herausforderung darstellt, ergibt sich damit der Vorteil mit humanem Material arbeiten zu können. Zwar kann derzeit nur im Tiermodell die gesamte Physiologie eines Organismus und Toxikokinetik von Substanzen zuverlässig abgebildet werden, jedoch erschwert auch hier die Speziesvariabilität die Extrapolation auf den Menschen. Bei der Entwicklung neuer Testmethoden wird zusätzlich angestrebt Aufschluss über die zugrundeliegenden toxischen Stoffwechselwege und Mechanismen, die von den Testsubstanzen angestoßen werden, zu erlangen. Metabolomischen Untersuchungen wird ein hohes Potenzial zugesprochen die genannten Aspekte zu adressieren, da sie Anwendung für *in vitro* Modelle finden, Testungen von Substanzgemischen möglich machen, durch hohe Sensitivität die Applikation von geringen Dosen begünstigen und mechanistische Einblicke gewähren können (Bouhifd et al., 2013).

1.1.1. Methodik

In *Metabolomics* Studien wird angestrebt, so viele endogene Metabolite wie möglich (Aminosäuren, Zucker, Lipide etc.) aus biochemischen Stoffwechselwegen eines

Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu analysieren. *Metabolomics* stellt eine der jüngsten *omics*-Technologien dar. Erhöhte mRNA-Level resultieren nicht zwangsläufig in einer Erhöhung translatierter Proteine und erhöhte Proteinlevel spiegeln nicht unbedingt die Aktivität dieser Proteine wider. Somit stellt ein metabolomisches Profil eine Momentaufnahme des biologischen Zustandes eines Systems dar. Daher ist der Vorteil von metabolomischen Analysen gegenüber *Transcriptomics* und *Proteomics* vor Allem die sogenannte „phenotypische Antwort“ (Goodacre et al., 2004). Interessant ist zudem die sehr viel geringere Anzahl von endogenen Metaboliten (ca. 6.000) im Vergleich zu Proteinen (> 100.000) und Transkripten (ca. 100.000), die in biologischen Systemen eine Rolle spielen (Hartung et al., 2012). Daher bieten metabolomische Analysen die Möglichkeit einen größeren Anteil des vollständigen Metaboloms für eine ganzheitliche Betrachtung erfassen zu können, als es z.B. im Bereich *Proteomics* möglich wäre. Allerdings stellt die Komplexität der strukturell und physikochemisch höchst verschiedenen Moleküle, welche in extrem variierenden Konzentrationen auftreten (z.B. Hormone vs. Aminosäuren) eine besondere Herausforderung für die Analytik dar (Maertens et al., 2016). Moderne massenspektrometrische Methoden gekoppelt mit vorgeschalteten Trennverfahren, zumeist Flüssigchromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC), machen es heute möglich eine Vielzahl von Metaboliten aus komplexen biologischen Matrices zu analysieren (Dettmer et al., 2007). Hierbei werden zielgerichtete und nicht-zielgerichtete *Metabolomics* Ansätze unterschieden. Während bei zielgerichteten Ansätzen die Anzahl und Art der zu messenden Metabolite genau festgelegt ist, werden bei nicht-zielgerichteten Ansätzen die vorhandenen Metabolite möglichst erschöpfend erfasst. Ersteres erzielt meist über analytische Standards ermittelte quantitative Daten, die z.B. mit einem Triple-Quadrupol-System (LC-MS/MS) aufgenommen und über *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) ausgewertet werden. Nicht-zielgerichtete Ansätze arbeiten meist mit hochauflösender Massenspektrometrie (z.B. LC-Orbitrap); wobei vor der Datenauswertung zunächst die Metabolitidentifizierung über Spektrenabgleich in

Datenbanken und z.T. aufwendigem manuellem Studium von Metabolitspektren erfolgt. Unabhängig vom Ansatz werden dabei große Datenmengen generiert. Es wird angenommen, dass gesunde Lebewesen oder unbehandelte biologische Systeme ein Metabolitenprofil besitzen, welches sich durch äußere Einflüsse, wie z.B. die Aufnahme von Substanzen verändert (Bouhifd et al., 2013). Diese Veränderungen von Metabolitmustern können unter Anwendung von multivariater Statistik analysiert werden (Ami et al., 2010). Zur initialen Dimensionsreduktion wird

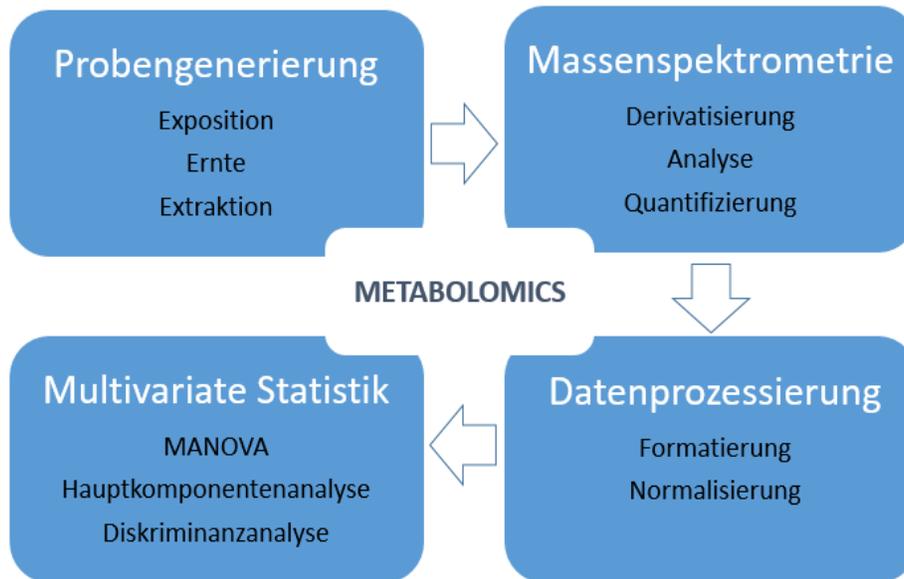


Abbildung 1: Schema zum Arbeitsablauf von Metabolomics Studien. Nachdem die Probe generiert wurde, folgt die massenspektrometrische Analyse. Anschließend werden die gewonnenen Datensätze ggf. nach Metabolitidentifizierung und/oder Quantifizierung für die multivariate statistische Analyse vorbereitet. Die anschließende multivariate Statistik gibt Aufschluss über veränderte Metabolit-Level und kann zur Identifizierung von Biomarkern und für die Analyse von Signalwegen genutzt werden. Abkürzung: *Multivariate Analysis of Variance* (MANOVA).

oft die Hauptkomponentenanalyse eingesetzt, welche eine unüberwachte Methodik darstellt. Hierbei werden ausschließlich die Werte der gegebenen Variablen einbezogen, ohne Berücksichtigung weiterer Informationen, wie

Gruppenzugehörigkeiten der unterschiedlichen Proben. Für die Identifizierung von Biomarkern werden zudem Diskriminanzanalysen herangezogen. Diese tragen nach vorheriger Definition der Probengruppen (z.B. unbehandelte Kontrolle vs. exponierter Ansatz) dazu bei, jene Metabolite zu isolieren, welche zur Trennung der Behandlungsgruppen führen und daher mit dem jeweiligen Gruppenkriterium assoziiert werden können. Über diese statistischen Verfahren kann dann Aufschluss über den Einfluss von Substanzen auf bestimmte biochemische Signalwege gewonnen werden. Abbildung 1 stellt den typischen Arbeitsablauf von *Metabolomics* Studien dar.

1.1.2. Anwendungsmöglichkeiten

Metabolomics Methoden sind bereits in groß angelegten toxikologischen Projekten wie z.B. *Toxicity Testing for the 21st century* (Tox-21 c) ein wichtiger Bestandteil (Bouhifd et al., 2013). Auch Chemikalienhersteller finden Anwendung für diese Methodik, um mögliche toxische Effekte von Substanzen zu identifizieren (van Ravenzwaay et al., 2012). Hierbei werden in der Toxikologie meist drei verschiedene Ziele verfolgt:

1. **Vergleiche von veränderten Metabolitprofilen, welche auf die Exposition mit unterschiedlichen Substanzen (z.B. Arzneistoffen oder Chemikalien) bekannter toxikologischer Wirkung zurückzuführen sind.** Hierbei werden die Metabolitmuster möglichst vieler Chemikalien erfasst und in einer Datenbank hinterlegt. Als biologische Probe wird oft Blutplasma aus Tierstudien verwendet, welche nach Richtlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) durchgeführt wurden. Zellkulturbasierte Ansätze kommen zunehmend zum Einsatz. Anhand dieser Daten lassen sich charakteristische Gruppen von Metaboliten identifizieren, dessen Muster auf bestimmte Endpunkte wie z.B. Lebertoxizität hinweisen. Diese Datenbank kann dann zur Prädiktion der Toxizität für neue Testsubstanzen genutzt werden (van Ravenzwaay et al., 2012).

2. **Identifizierung von Biomarkern, die molekulare Indikatoren für spezielle pathogene Prozesse darstellen.** Dieser Ansatz verfolgt das Ziel substanzspezifische Biomarker zu identifizieren, die auf die Exposition mit bestimmten Chemikalien hinweisen und möglichst konzentrationsabhängig reagieren. Es kann sich dabei ebenfalls um eine Gruppe von Biomarkern handeln, die sich aus verschiedenen Metaboliten mit veränderten Leveln zusammensetzt. Auch für die Untersuchung bestimmter Signalwege ist dieser Ansatz anwendbar, indem z.B. die Veränderungen der Biomarker Gruppen nach gezielter Inhibition von Schritten in Signalwegen studiert wird. Dieses Vorgehen beleuchtet mechanistische Vorgänge (Jungnickel et al., 2014).
3. **Aufdeckung neuer toxikologischer Signalwege und Mechanismen, die durch die Änderung bestimmter Metabolite aus Stoffwechselwegen sichtbar werden.** Diese Analyse des Metaboloms dient hauptsächlich der Entdeckung neuer Anhaltspunkte für unbekannte oder nicht ausreichend aufgeklärte toxikologische Mechanismen nach Substanzexposition. Hierbei können unterstützend Netzwerkanalysen herangezogen werden. Die identifizierten Signalwege werden anschließend durch komplementäre Methoden verifiziert und weiterführend mit molekularbiologischen Methoden untersucht (Johnson et al., 2016).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Metabolomanalysen vielfältig für die Exposition von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) und endokrinen Disruptoren eingesetzt. Auch Ko-Expositionsszenarien mit dem Schwermetall Cadmium (Cd^{2+}) wurden untersucht. Als biologische Systeme fungierten humane Zelllinien (HaCaT und MCF-7). Eine Beschreibung der Untersuchungen und biologischen Systeme ist dem Kapitel Zielsetzung (1.3.) zu entnehmen.

1.2. Verbrauchernahe Chemikalien

1.2.1. PAKs

PAKs bestehen aus mindestens zwei kondensierten aromatischen Ringen. Sie entstehen bei Verbrennungsprozessen z.B. beim Grillen von Fleisch oder im Tabakrauch (Luch and Baird, 2010). Daher sind PAKs in komplexen Gemischen ubiquitär in der Umwelt vertreten: in der Umgebungsluft, in Nahrungsmitteln und im Erdboden (Lewtas, 2007; Lijinsky, 1991). Zudem sind diese Verbindungen in Rohöl und Ruß enthalten, welches für die Produktion von Gummimaterialien, Plastik und Elastomeren verwendet wird. Daher ist die tägliche Exposition des Verbrauchers mit PAKs über vielfältige Routen (pulmonal, peroral, dermal) möglich. Dermalen Kontakt mit PAKs über verbrauchernahe Produkte (z.B. Werkzeuggriffe und Schmieröle) und anschließende Migration wurde als wichtiger Expositionsweg für verschiedene PAKs identifiziert. Auch die perkutane Absorption wurde bereits gezeigt (Bartsch et al., 2016; Paschke et al., 2015). Außerdem ist eine starke Korrelation zwischen der dermalen Exposition mit PAKs und dem Auftreten von Hautkrebs bekannt (Boffetta et al., 1997). Karzinogene PAKs werden zunächst metabolisch aktiviert bevor sie an Makromoleküle wie DNA binden können (Luch and Baird, 2010). Cytochrom-P450 Enzyme (CYPs), insbesondere CYP1A1, 1A2 und 1B2 sind hauptsächlich in der Biotransformation von PAKs beteiligt (Shimada, 2006; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004). Viele PAKs mit einem buchtförmigen Bereich im Molekül zwischen drei Benzolringen (Bay-Region), wie Benzo[*a*]pyren (BAP), werden durch CYP1A1 aktiviert (Schwarz et al., 2001). Bei PAKs, deren Struktur einen erweiterten buchtförmigen Bereich zwischen 4 Benzolringen aufweist (Fjord-Region), wie Dibenzo[*a,h*]pyren (DALP), spielt CYP1B1 bei der Aktivierung eine größere Rolle (Buters et al., 2002). Die enzymatische Generierung von sterisch gehinderten Bay- und Fjord-Region Diolepoxiden und die anschließende Bildung von DNA-Addukten, welche zu Mutationen führen können, werden als dominante Mechanismen in der chemischen Karzinogenese angesehen (Hall and Grover, 1990). Neben der

Aktivierung durch CYP Enzyme, sind zwei weitere Metabolisierungswege von Bedeutung: die Bildung von Radikalkationen durch Einelektronen-Oxidation über Peroxidasen (Cavalieri and Rogan, 1995), sowie die Bildung von *ortho*-Chinonen durch Dihydrodiol-Dehydrogenasen (Penning et al., 1996). Letzterer führt zu Redoxcycling und zum Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Es wird angenommen, dass alle drei Wege des Metabolismus zu unterschiedlichem Ausmaß an der PAK induzierten Karzinogenese beteiligt sind (Xue and Warshawsky, 2005). Die Leitsubstanz der PAKs, welche als Repräsentant der gesamten Substanzklasse steht und bereits intensiv erforscht wurde stellt BAP dar. BAP wurde von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als Karzinogen der Kategorie 1 (karzinogen für den Menschen) eingestuft (IARC, 2010). Chrysen (CRY) besitzt ebenfalls eine Bay-Region und kann in reaktive Diolepoxide umgewandelt werden (Nordqvist et al., 1981), es zeigt aber eine geringere karzinogene Potenz und wurde in Kategorie 2B (möglicherweise karzinogen für den Menschen) eingestuft. Das Fjord-Region enthaltende PAK DALP stellt ein sehr potentes Karzinogen in Tierstudien dar (Ralston et al., 1994), und wurde in die Kategorie 2A (wahrscheinlich karzinogen für den Menschen) eingestuft. PAKs fungieren als Liganden des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) (Denison and Nagy, 2003). Dieser Liganden-abhängige Transkriptionsfaktor wird im Zytosol von entsprechenden PAKs gebunden und aktiviert. Darauf transloziert er in den Zellkern, bindet dort an spezifische DNA-Motive (sogenannte *xenobiotic response elements* (XREs)) und moduliert dadurch die Expression von verschiedenen Zielgenen (siehe Abbildung 2). XREs befinden sich vor allem in Promotoren von Zielgenen, welche für Enzyme aus dem Phase I (z.B. CYP1A1) und Phase II (z.B. Glutathion-S-Transferase) Metabolismus von Xenobiotika codieren. Daher kann die Induktion des Phase I Metabolismus durch die Aktivierung von z.B. CYP1A1 zu einer beschleunigten Metabolisierung von PAKs führen. Dadurch können weitere aktivierte Intermediaten entstehen, was zu vermehrter DNA-Schädigungen führen kann. Zusätzlich kann AHR Aktivierung Faktoren von Prozessen des Zellwachstums (z.B. Serin/Threonin Kinasen wie COT), des Zellzyklus (z.B. Cyclin

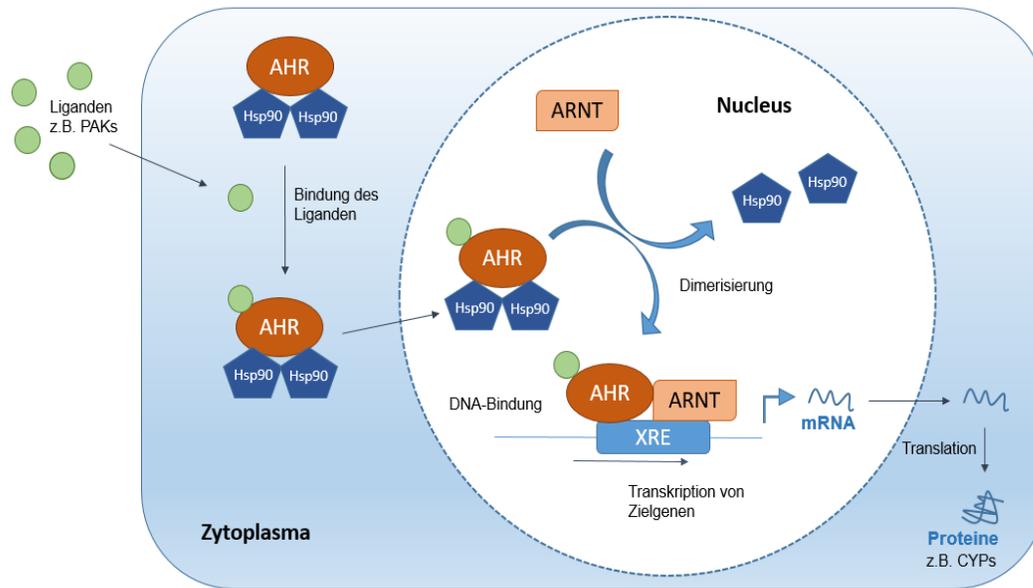


Abbildung 2: Kanonischer AHR Signalweg. Der AHR liegt zytosolisch in einem Proteinkomplex mit u.a. einem Dimer aus Hsp90 vor. Nachdem ein AHR-Ligand (z.B. BAP) bindet wird durch die resultierende Konformitätsänderung die Translokation in den Zellkern aktiviert. AHR dissoziiert dort vom Proteinkomplex ab und bildet ein Heterodimer mit seinem nuklearen Translokator ARNT. Der AHR/ARNT-Komplex kann anschließend durch Bindung an spezifische DNA-Motive, klassischerweise den XREs, die Transkription von Zielgenen modulieren. Dies resultiert in spezifisch veränderter mRNA Produktion (z.B. von CYPs). Nach Ausschleusung in das Zytoplasma kann gebildete mRNA in Proteine (z.B. CYP1A1) translatiert werden, welche anschließend ihre Funktion in der Zelle (z.B. Metabolismus von PAKs) aufnehmen können. Abkürzungen: Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR), Hitzeschockprotein (Hsp90), AHR nuklearer Translokator (ARNT), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), *xenobiotic response element* (XRE).

B2), sowie der Apoptose (z.B. Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF)) beeinflussen (Frueh et al., 2001; Puga et al., 2000).

Gerade in den letzten Jahren wurden viele Erkenntnisse über den AHR gewonnen die über die kanonische Aktivierung des AHR und den Einfluss auf die Bioaktivierung von Umweltchemikalien und Karzinogenen hinausgehen. Es wurden einige endogene

AHR Liganden identifiziert, welche z.B. Metabolite der Aminosäure Tryptophan darstellen (z.B. Kynurenin). Aber auch natürliche Verbindungen aus pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Flavonoide wurden als schwach wirksame AHR Aktivatoren charakterisiert (Murray et al., 2014). Die Vertiefung des Wissens über mögliche physiologische Funktionen des AHRs, welche die Leberfunktion, das Immunsystem, sowie kardiovaskuläre und neuronale Funktionen betreffen, stehen weiter im Fokus der Wissenschaft (Guyot et al., 2013). Auch bei inflammatorischen Prozessen spielt der AHR eine wichtige Rolle. So wurde entdeckt, dass der nukleäre Faktor *kappa* B (NF κ B) den AHR-ARNT Komplex und die AHR Aktivierung hemmen kann, was zu einer veränderten Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt. Außerdem können Steroidrezeptorfunktionen durch den AHR moduliert werden, indem der Liganden-aktivierte AHR direkt mit dem Estrogenrezeptor *alpha* (ER α) assoziiert und beispielsweise als E3 Ubiquitin Ligase zur Proteolyse des Estrogenrezeptors führt (Ohtake et al., 2009).

Für viele PAKs, besonders ab einer Anzahl von 4 aromatischen Ringen, wird eine karzinogene Wirkung auf den Menschen vermutet. Da PAKs in komplexen Gemischen auftreten, ist die Regulation dieser Substanzklasse eine Herausforderung. Einige PAK-Mischungen sind bereits als Klasse 2A/B Karzinogene eingestuft worden (IARC, 2014, 2010). Die von Behörden gesetzten Grenzwerte für PAKs zielen auf eine kontinuierliche Reduzierung dieser Verbindungen nach dem ALARA-Prinzip (*as low as reasonable achievable*) ab (BFR, 2010). In verbrauchernahen Produkten die in der EU vertrieben werden, darf seit Dezember 2015 nur noch 1 mg/kg für jede einzelne PAK-Verbindung nachweisbar sein (Verordnung (EU) 1272/2013, 2013). Bei Spielzeugen für Kleinkinder oder Säuglinge wurde ein Grenzwert von 0,5 mg/kg festgelegt (BFR, 2014). Derzeit wird die Karzinogenität von PAK-Verbindungen in einer 2-Jahres Studie an Nagetieren getestet (Tilton et al., 2015). Diese Langzeitstudien im Tiermodell sind für das Screening von einer großen Anzahl von Verbindungen und Mischungen wenig geeignet. Für die Risikobewertung der Karzinogenität von PAKs in Gemischen wird BAP als Modellschubstanz für die gesamte

Substanzklasse herangezogen (US EPA, 2010). Betrachtet man die verschiedenen PAK-Verbindungen, welche unterschiedlich metabolisiert werden und unterschiedliche Affinität zum AHR aufweisen im Zusammenhang mit den komplexen Auswirkungen der AHR Aktivierung, ist es naheliegend, dass PAKs sich in ihren toxischen Effekten unterscheiden können, die nicht aus einem einzigen Toxizitätsmechanismus resultieren müssen (Siddens et al., 2012). Interaktionen und nicht-additive Effekte sind wahrscheinlich, wenn diese Substanzen in Mischungen auftreten (Jarvis et al., 2014). Daher ist es weiterhin wichtig, neue Strategien für die Risikobewertung von PAKs in Gemischen und neue Testsysteme für diese Verbindungen zu entwickeln.

1.2.2. Endokrine Disruptoren

Fremdstoffen, die in das endogene Hormonsystem von Organismen eingreifen, werden als *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) bezeichnet (Colborn et al., 1993). Die *World Health Organization* (WHO) definiert einen Stoff als EDC, wenn er einen adversen Effekt auf die menschliche Gesundheit besitzt, eine endokrine Wirkungsweise aufweist und eine Kausalbeziehung zwischen dem adversen Effekt und der endokrinen Wirkungsweise besteht (OECD/IPCS, 2002). Zu EDCs gehören diverse Verbindungen, welche keine definierte Substanzgruppe darstellen. Für die eindeutige Identifizierung von Substanzen als EDCs arbeiten Wissenschaftler nach wie vor an einem allgemeingültigen Konsens (Solecki et al., 2016). EDCs können natürliche Bestandteile der Nahrung sein. Beispiele sind Phytohormone, wie Isoflavone, welche in Soja vorkommen, oder Umweltgifte wie polychlorierte Biphenyle. Auch Pestizide wie Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), bestimmte Konservierungsmittel wie Benzophenon oder Weichmacher wie Phthalate stellen EDCs dar. Sie liegen häufig in niedrigen, physiologisch wirksamen Konzentrationen vor und werden in Substanzgemischen wie komplexen Umweltproben nachgewiesen. Das vermehrte Vorkommen von EDCs in der Umwelt wurde mit der Abnahme der humanen Samenqualität und -quantität assoziiert und spielt möglicherweise eine Rolle bei der erhöhten Inzidenz von Hoden- und Brustkrebs in

den letzten Jahrzehnten (Soto et al., 2006). Der adverse Effekt auf das Hormonsystem resultiert aus Einwirkungen auf die Steroidsynthese oder den Steroidmetabolismus und beruht auf agonistischer oder antagonistischer Bindung von nukleären Hormonrezeptoren. Zu diesen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören v.a. der ER, sowie der Androgen-, und

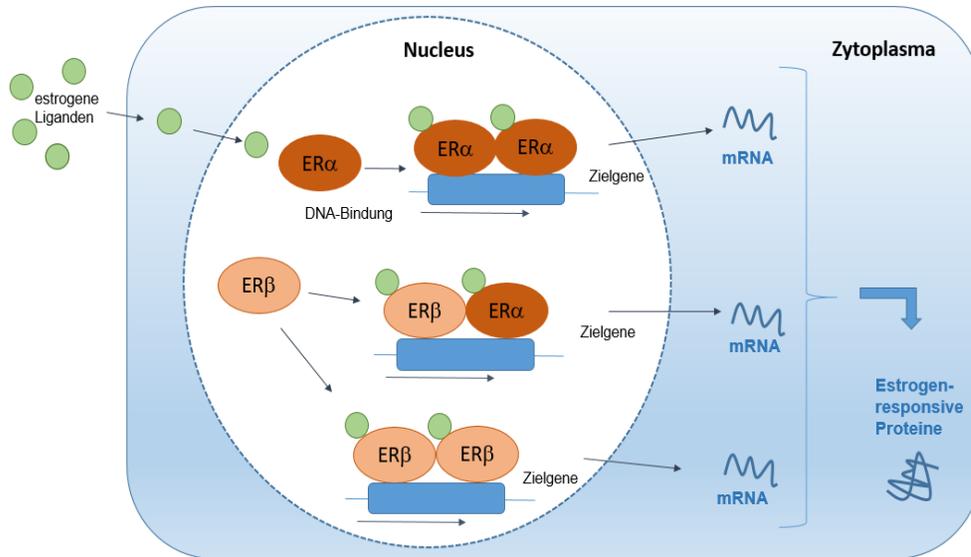


Abbildung 3: Mechanismus der Aktivierung von nukleärer Estrogenrezeptoren.

Estrogen gebundene ER α und ER β binden an das ERE und bilden Homo- oder Heterodimere, welche zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen führt. Resultierende mRNA Transkripte werden in Estrogen-responsive Proteine translatiert, was zur Manifestation der estrogenen Wirkung führt. Abkürzungen: Estrogen Rezeptor (ER), Estrogen-Response-Element (ERE).

Progesteronrezeptor. Der ER, welcher mindestens in zwei Isoformen (ER α und ER β) vorkommt, befindet sich hauptsächlich im Zellkern. Dort bindet er 17 β -Estradiol (E2) oder estrogenähnliche Verbindungen. Die Estrogen-gebundene Rezeptorform homo- oder heterodimerisiert und bindet anschließend an ein spezifisches *Estrogen-Response-Element* (ERE) an genomischer DNA (siehe Abbildung 3). Diese Bindung führt zu einer Transkriptionsaktivierung verschiedener Zielgene. Die Aktivierung von ERs beeinflusst viele physiologische Prozesse, wie die weibliche sowie männliche

Entwicklung, das Reproduktionssystem beider Geschlechter, die kardiovaskuläre Gesundheit, den Knochenstoffwechsel, sowie Kognition und Verhalten (Deroo and Korach, 2006).

Ein vielseitig untersuchter synthetischer EDC ist Bisphenol A (BPA). Die hormonelle Wirkung von BPA wird über den ER vermittelt, an welchem BPA ähnlich dem Sexualhormon E2 bindet und somit die Expression von Zielgenen moduliert (Li et al., 2013). BPA bildet als Monomer die Grundlage für Polycarbonat-Kunststoffe, die zur Herstellung von Behältnissen für Lebensmittel und Getränke verwendet werden. Außerdem wird BPA für die Herstellung von Epoxidharzen zur Innenbeschichtung von Getränke- und Konservendosen verwendet (Gao et al., 2012). Der Einsatz von BPA als Entwickler in Thermopapier stellt eine weitere Expositionsmöglichkeit für den Verbraucher dar (Mendum et al., 2011). Trotz einer Vielzahl von Studien zur Toxizität von BPA, wird weiterhin kontrovers diskutiert ob eine schädigende Wirkung auf die Gesundheit vorliegt (Hengstler et al., 2011). Einer umfassenden Neubewertung von BPA durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) zufolge, übersteigt die tägliche Exposition über die Aufnahme von Nahrungsmitteln keiner Altersgruppe den aktuellen Grenzwert von 4 Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (EFSA, 2015). Demnach geht keine Gesundheitsgefahr von BPA aus. Allerdings werden weiterhin mögliche Effekte im Niedrigdosisbereich, sowie Mischungseffekte in Verbindung mit BPA diskutiert. Daraus resultierte bereits ein Verbot von BPA in Babyflaschen (Commission-Directive, 2013).

Das Schwermetall Cd^{2+} steht im Verdacht als sogenanntes Metalloestrogen endokrin aktiv zu sein. Als weit verbreitete persistente Umweltkontaminante besitzt Cd^{2+} eine Tendenz zur Bioakkumulation (Fernandez-Leborans et al., 2007). In der wissenschaftlichen Literatur herrscht allerdings Uneinigkeit darüber, ob und wie Cd^{2+} ERs modulieren kann (Silva et al., 2012). Cd^{2+} kommt in einer Vielzahl von verbrauchernahen Produkten vor, z.B. in Keramik oder Kunststoffmaterialien (PVC), sowie in Zigarettenrauch. Kombinationseffekte von Cd^{2+} , endogenen Estrogenen und Xenoestrogenen sind bisher wenig untersucht. Da der Verbraucher einem

Cocktail an potenziell endokrin aktiven Substanzen ausgesetzt ist, ist die Untersuchung von Kombinationswirkungen von Cd^{2+} mit anderen Substanzen von hoher Relevanz.

Da gerade im Bereich der Reproduktionstoxikologie bei *in vivo* Studien eine große Anzahl an Tieren benötigt wird und eine sehr hohe Anzahl von synthetischen Chemikalien (> 30.000) auf ihre endokrine Aktivität getestet werden muss, hat die OECD ein Konzept erarbeitet, in dem *in vitro* Methoden für das initiale Screening eine sehr große Rolle spielen (Gelbke et al., 2004). Im ersten Schritt konzentriert sich dieses Konzept auf bereits existierenden Informationen der zu testenden Substanz (z.B. physikochemische Eigenschaften). Anschließend werden *in vitro* Methoden wie Rezeptorbindungsstudien oder transkriptionale Aktivierung verwendet, bevor *in vivo* Studien in Betracht gezogen werden sollen. Allerdings fehlt es an verlässlichen *in vitro* Methoden, welche nicht nur isolierte Aspekte (Endpunkte) betrachten und die sichere Identifizierung von EDCs erzielen, was sich nicht zuletzt an den oft kontrovers geführten Diskussionen um die Bewertung der gesundheitlichen Risiken durch endokrin wirksame Substanzen ablesen lässt

2. Zielstellung

In der modernen Toxikologie ist die Entwicklung neuer prädiktiver und robuster *in vitro* Testmethoden zur Reduktion von Tierversuchen dringend erforderlich. Zusätzlich wird die Anpassung von Versuchsdosen auf tatsächliche Expositionsmengen mit denen der Mensch in Kontakt kommt angestrebt. Zudem gibt es großen Bedarf, toxische Signalwege, welche durch Chemikalien beeinflusst werden, zu verstehen und aufzuklären. Im Alltag ist der Verbraucher gleichzeitig einer Vielzahl von Chemikalien ausgesetzt, welche aus natürlichen oder anthropogenen Quellen wie Kosmetika, Kunststoffen oder Gummimaterialien stammen können. Daher ist die Entwicklung neuer *in vitro* Teststrategien, welche auch Mischungseffekte in Betracht ziehen können, von besonderer Bedeutung. Anhand dieser Testmethoden sollen neue Risikobewertungsstrategien abgeleitet werden, welche eingesetzt werden können, um den Verbraucher adäquat zu schützen.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich methodisch auf Metabolomanalysen (siehe 1.1.), welche als vielversprechend für die Anwendung für *in vitro* Untersuchungen im Niedrigdosisbereich gelten. Als Testsubstanzen wurden einerseits karzinogene PAKs (siehe 1.2.1.), die hormonell wirksame Industriechemikalie BPA (siehe 1.2.2.), sowie das Schwermetall Cd^{2+} (siehe 1.2.2.) untersucht. Diese Chemikalien stehen im Bereich der gesundheitlichen Risikobewertung immer wieder im Fokus. Als biologische Testsysteme wurden permanente humane Zelllinien gewählt. Da die dermale Exposition bei PAKs toxikologisch eine Rolle spielt, wurde eine metabolisch kompetente Keratinozytenzelllinie verwendet (HaCaT). Keratinozyten stellen den größten Anteil an Zellen in der Epidermis dar, daher können Vorgänge in der menschlichen Haut mit diesen abgebildet werden (Boukamp et al., 1988). Um Effekte des AHRs (siehe 1.2.1.) zu untersuchen, wurden ebenfalls AHR-defiziente HaCaT Zellen (AHR-KD) eingesetzt (Fritsche et al., 2007). Für die Untersuchung des Xenohormons BPA im Vergleich zu E2, sowie von Ko-Expositionseffekten von BPA, E2 oder dem PAK BAP mit dem möglicherweise endokrin wirksamen Schwermetall

Cd^{2+} wurde eine humane Brustkrebszelllinie (MCF-7) gewählt. Diese weist metabolische Kompetenz auf und ist mit ERs, sowie dem AHR ausgestattet. Um Effekte des AHRs aufzuzeigen wurden ebenfalls AHR-defiziente MCF-7 Zellen (MCF-7AHR₂₀₀) eingesetzt. MCF-7 Zellen werden standardmäßig für die Messung von Proliferationseffekten mittels *E-Screen* verwendet, daher stellen sie besonders für die Untersuchung von EDCs ein sehr gut etabliertes System dar (Villalobos et al., 1995). Zunächst wurden Methoden für die Ernte, Extraktion und Analyse des Metaboloms in diesen Zelllinien etabliert. Anschließend kamen diese zum Einsatz für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten metabolomische Untersuchungen in HaCaT Zellen durchgeführt werden. Hierbei sollte differentiell untersucht werden, wie einzelne Verbindungen der Substanzklasse der PAKs das Metabolom in HaCaT Zellen verändern:

- Der Einfluss der drei ausgewählten PAKs (CRY, BAP und DALP) auf die Viabilität, sowie CYP1A1 und CYP1B1 Expression auf RNA und Proteinebene sollte zunächst charakterisiert werden.
- Metabolite sollten als neue potentielle Biomarker identifiziert werden, welche prädiktiv für die Exposition mit PAKs sind.
- Durch PAKs beeinflusste biochemische Stoffwechselwege sollten identifiziert werden und AHR-abhängige von AHR-unabhängigen Effekten unterschieden werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Wirkung von endokrinen Disruptoren auf MCF-7 Zellen untersucht werden. Auch Mischungseffekte sollten hier adressiert werden, indem mögliche estrogenen Eigenschaften von Cd^{2+} allein und in Kombination mit endogenem E2 sowie dem Xenohormon BPA untersucht wurden:

- Es sollte zunächst ein Metabolitmuster identifiziert werden welches mit estrogenen Effekten in MCF-7 Zellen assoziiert werden kann.

- Darauf sollten estrogene Effekte von Cd²⁺ in Ko-Expositions-Szenarien unter Anwendung verschiedener *in vitro* Methoden (E-Screen, Reportergen-Assay, *Metabolomics*) untersucht werden.
- Estrogene Biomarker sollten nach metabolomischer Untersuchung und statistischer Analyse identifiziert und verifiziert werden.
- Relevante Signalwege sollten identifiziert und weiterführend untersucht werden.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein *in vitro* Testsystem, welches auf metabolomischen Daten basierend mit schrittweiser Inhibition von toxikologischen Signalwegen arbeitet und die Möglichkeit bietet synergistische Effekte von Ko-Expositionsszenarien zu erfassen, entwickelt werden kann. Der Fokus lag hierbei auf Mischungseffekten von PAKs, insbesondere BAP und Schwermetallen, insbesondere Cd²⁺:

- Es sollte eine Gruppe von Biomarkern identifiziert werden, welche auf Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ in niedrigen Dosen reagiert und im multivariaten statistischen Modell zu einer Separation der Behandlungsgruppen führt.
- Signifikante metabolomische Veränderungen sollten anschließend in einem Farbmodell visualisiert werden und ein Schlüsselmechanismus für die Ko-Exposition sollte erarbeitet werden.
- Anhand des Schlüsselmechanismus sollten spezifische Inhibitoren eingesetzt werden welche gezielt Schritte in den identifizierten Signalwegen hemmen und die Bildung von Biomarker-Untergruppen, welche auf diese reagieren ermöglichen.
- Anschließend sollte ein Ansatz für ein Testsystem erarbeitet werden, welches auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse für weitere Ko-Expositionsszenarien von PAKs und Schwermetallen mit ähnlichem Mechanismus anwendbar ist.

3. Ergebnisse

3.1. Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,l*]pyrene

Sarah Potratz, Harald Jungnickel, Stefan Grabiger, Patrick Tarnow, Wolfgang Otto, Ellen Fritsche, Martin von Bergen und Andreas Luch

Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,l*]pyrene

Toxicology Reports, 2016, 3, 763-773

Doi: 10.1016/j.toxrep.2016.09.003

Link: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.09.003>

In dieser Publikation wurden die Wirkungen dreier PAKs unterschiedlicher karzinogener Potenz und AHR Bindungsaffinität (CRY, BAP und DALP) auf das Metabolom von HaCaT Zellen untersucht. Diese metabolisch kompetente humane Keratinozytenzelllinie wurde als *in vitro* Model gewählt um Vorgänge in der menschlichen Haut zu simulieren. Zur Differenzierung von AHR-Rezeptor abhängigen und unabhängigen Effekten, wurden parallel AHR-KD Zellen eingesetzt. Zur initialen Charakterisierung des Einflusses der drei PAKs auf die Zelllinien, wurde die Zytotoxizität und CYP1A1 sowie CYP1B1 Expression auf RNA- und Proteinebene untersucht. Während BAP nur eine minimale Zytotoxizität in Wildtyp (WT) und AHR-KD Zellen aufwies, zeigte die Exposition mit CRY moderate zytotoxische Effekte in beiden Zelllinien. DALP hingegen zeigte starke zytotoxische Effekte in WT Zellen und

keine Verringerung der Viabilität in AHR-KD Zellen. Untersuchung der CYP1A1 und CYP1B1 Expression auf RNA- und Proteinebene ergab eine konzentrationsabhängige starke Induktion beider Enzyme durch BAP, eine moderate durch CRY und eine minimale bis keine Induktion durch DALP. In AHR-KD Zellen hingegen, waren die CYP-Level erwartungsgemäß nicht oder nur minimal induziert. Anschließend wurde ein zielgerichteter *Metabolomics* Ansatz durchgeführt bei dem 166 endogene Metabolite (Aminosäuren, biogene Amine, Carnitine, Phospholipide, Sphingomyeline und Hexose) mittels LC- und Fließinjektionsanalyse (FIA)-MS/MS analysiert wurden. Nach multivariater statistischer Analyse wurden 24 Metabolite (das biogene Amin *alpha*-Aminoadipinsäure, acht Carnitine, die Aminosäure Glutamin (Gln), 13 Phospholipide und ein Sphingomyelin) als Biomarker identifiziert, welche die distinkte Wirkweise der einzelnen Verbindungen der Substanzgruppe der PAKs herausstellen. Im Weiteren wurden substanzspezifische Veränderungen der endogenen Metabolit-Level visualisiert und somit die unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen PAKs herausgearbeitet. Einflüsse auf den Energiestoffwechsel und den Lipidmetabolismus wurden hierbei abgeleitet.

Anteil des Autors an der Publikation: Projektplanung (80%), Projektdurchführung (70%), Datenanalyse (90%), Schreiben des Manuskripts (70%).

3.2. Combination of metabolomics with cellular assays reveals new biomarkers and mechanistic insights on xenoestrogenic exposures in MCF-7 cells

Sarah Potratz, Patrick Tarnow, Harald Jungnickel, Sven Baumann, Martin von Bergen, Tewes Tralau und Andreas Luch

Combination of metabolomics with cellular assays reveals new biomarkers and mechanistic insights on xenoestrogenic exposures in MCF-7 cells

Chemical Research in Toxicology, 2016, Systems Toxicology II

Doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00106

Link: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrestox.6b00106>

In dieser Publikation wurden Effekte von E2, BPA und Cd²⁺ auf die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht, um Biomarker für endokrine Effekte zu identifizieren. Hierbei wurden einerseits Mischungseffekte adressiert, sowie substanzindividuelle Effekte herausgearbeitet und weiter mechanistisch untersucht. Initial wurden per *E-Screen* die Proliferationseffekte von E2 und BPA in MCF-7 Zellen bestätigt. Anschließend wurden Metabolomics Experimente durchgeführt, bei denen die Zellen mit E2 und BPA Konzentrationen gleicher Potenz exponiert wurden. Zusätzlich wurden Ko-Expositionsexperimente mit E2 oder BPA und dem Schwermetall Cd²⁺ durchgeführt. Nach E2 und BPA Exposition wurden 29 Metabolite (fünf Aminosäuren, 21 Phospholipide und drei Sphingomyeline) statistisch signifikant reguliert. Eine Diskriminanzanalyse zeigte die unterschiedlichen Wirkweisen von E2 und BPA durch eine klare Abtrennung der Behandlungsgruppen. Eine Gruppe von elf Metaboliten wurde nach E2 sowie nach BPA Exposition reguliert und konnte daher mit estrogenen Effekten assoziiert werden. Die Betrachtung der Cd²⁺ Effekte auf die durch E2 und BPA regulierten Metabolite mit Hilfe eines Farbmodells zeigte einen geringen modulierenden Einfluss von Cd²⁺ auf das veränderte Metabolitmuster.

Durch zelluläre Assays wie dem *E-Screen* und Expressionsexperimenten zu den ER-Zielgenen *PGR*, *CCND1*, *TFF1* und *HSPB8* konnten jedoch keine Effekte durch Cd²⁺ in der Ko-Exposition mit E2 nachgewiesen werden. Im Weiteren konzentrierte sich die Publikation auf die Aminosäure Prolin (Pro), welche nach Exposition mit E2 sowie BPA stark erhöht war und daher als estrogener Biomarker postuliert wurde. Durch das Messen von Pro-Leveln über eine komplementäre Methode konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Pro-Konzentrationen in E2 oder BPA exponierten MCF-7 Zellen mit dem im *E-Screen* gemessenen Proliferationseffekt korreliert. Weiterführende siRNA *knockdown* Experimente und der Einsatz von ER Inhibitoren bestätigten die Abhängigkeit der Pro-Level Erhöhung von ER α . Zusätzliche Experimente zeigten eine Beteiligung des Onkogens MYC in diesem untersuchten Signalweg.

Anteil des Autors an der Publikation: Projektplanung (60%), Projektdurchführung (60%), Datenanalyse (90%), Schreiben des Manuskripts (70%).

3.3. Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[*a*]pyrene and cadmium: the toxicological cascade biomarker approach

Harald Jungnickel, Sarah Potratz, Sven Baumann, Patrick Tarnow, Martin von Bergen und Andreas Luch

Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[*a*]pyrene and cadmium: the toxicological cascade biomarker approach

Environmental Science and Technology, 2014, 48, 10423-10431

Doi: 10.1021/es502419w

Link: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es502419w>

In dieser Studie wurde in MCF-7 Zellen ein experimenteller *in vitro* Ansatz für Ko-Expositionen im Niedrigdosisbereich von PAKs, wie BAP, mit Schwermetallen, wie Cd²⁺, erarbeitet. Über ein multivariates statistisches Modell wurden 18 Lipidbiomarker identifiziert, welche signifikante Metabolit-Level-Veränderungen zeigten und ausreichend für die Separation von BAP behandelten Zellen, sowie BAP und Cd²⁺ ko-exponierten Zellen von unbehandelten Kontrollen waren. Über ein Farbmodell wurden die Ergebnisse der Metabolit-Veränderungen visualisiert. Innerhalb der 18 Lipidbiomarker wurden unterschiedliche Wirkungsweisen identifiziert. Ausschließlich mit Cd²⁺ behandelte Zellen wiesen keine signifikanten Metabolit-Level-Veränderungen auf. Hingegen zeigten zwei Lipide, ein Sphingomyelin und ein Lysophosphatidylcholin, nur in ko-exponierten Zellen signifikante Veränderungen, während BAP behandelte Zellen auf Kontrollniveau verblieben. Darüber hinaus, zeigten elf der identifizierten Biomarker eine weitere Erhöhung der Metabolit-Level nach BAP und Cd²⁺ Ko-Exposition im Vergleich zur alleinigen BAP Behandlung. Die Ergebnisse weisen auf synergistische Effekte von BAP in Kombination von Cd²⁺ hin. In AHR-defizienten MCF-7AHR₂₀₀ Zellen zeigten

die 18 Lipidbiomarker keine signifikante Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, sodass ein Einfluss des AHR Signalwegs auf die Lipid-Level-Erhöhung angenommen wurde. Als Schlüsselsignalweg für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ wurde eine durch Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) Aktivierung verstärkte Aktivierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) HER2 identifiziert, welcher mit proliferativen und karzinogenen Eigenschaften der Testsubstanzen in Verbindung gebracht wurde. Durch Inhibition von Schritten im identifizierten Signalweg in weiteren metabolomischen Analysen, wurde ein mechanistischer „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ erarbeitet. PC-PLC wurde mittels D609 inhibiert und zwei Komponenten des HER2 Signalwegs, der Transkriptionsfaktor c-Fos, sowie *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (MKP-1), mittels Ro-318220. Untergruppen von Biomarkern konnten somit mit den verschiedenen Schritten im postulierten Signalweg assoziiert werden. Der „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ wurde als *in vitro* Testsystem postuliert, welches für die Untersuchung von Ko-Expositionen von PAKs, insbesondere BAP, und Schwermetallen verwendet werden kann um die tumorigene Potenz von Testsubstanzen, sowie mögliche synergistische oder additive Effekte zu identifizieren.

Anteil des Autors an der Publikation: Projektplanung (20%), Projektdurchführung (80%), Datenanalyse (10%), Schreiben des Manuskripts (10%).

4. Diskussion

4.1. Differentielle Veränderungen zellulärer Metabolite in HaCaT Zellen nach Exposition mit drei karzinogenen PAKs: CRY, BAP und DALP

In dieser Studie werden erstmals metabolomische Untersuchungen in HaCaT Zellen nach Exposition mit den drei PAKs CRY, BAP und DALP präsentiert. Eine Charakterisierung der Effekte der drei PAKs auf die Viabilität und CYP-Expression von HaCaT WT und AHR-KD Zellen lässt auf das Ausmaß der Metabolisierung und der AHR Affinität schließen. Differentiellen Änderungen in den Leveln von 166 gemessenen endogenen Metaboliten nach PAK Exposition werden aufgezeigt. 24 identifizierte Biomarker stellen die Unterschiede der PAK-Expositionsgruppen CRY, BAP und DALP heraus.

4.1.1. PAK-Einfluss auf Viabilität und CYP-Expression in HaCaT Zellen

Als Leitsubstanz der PAKs ist BAP bereits intensiv erforscht worden. Hingegen adressiert diese Studie zum ersten Mal die Wirkung von CRY und DALP in HaCaT WT und AHR-KD Zellen im Vergleich zu BAP. In metabolisch kompetenten HaCaT Zellen wird BAP zum karzinogenen (-)-*anti*-BAP-7,8-diol-9,10-epoxid biotransformiert (Marie et al., 2008). Darüber hinaus sind pro-apoptotische Effekte für BAP in HaCaT Zellen bekannt (Stolpmann et al., 2012). Allerdings zeigt BAP nur eine geringe Zytotoxizität in WT und AHR-KD Zellen. Hingegen bewirkt BAP Exposition in WT Zellen eine starke CYP1A1, sowie CYP1B1 Induktion auf RNA- und Proteinebene. Diese wird in WT Zellen sehr wahrscheinlich durch eine Aktivierung des AHR ausgelöst, für welchen BAP ein potenter Ligand darstellt (Nebert et al., 2000). Die ausbleibende CYP-Induktion in AHR-KD Zellen bestätigt diese Annahme. Da die CYP-Level in AHR-KD Zellen durch die AHR-Defizienz vergleichsweise gering sind, ist der Metabolismus von BAP in diesen Zellen unwahrscheinlich, was eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Zytotoxizität darstellt. Die starke AHR Aktivierung in

WT Zellen kann außerdem zur Aktivierung von Schutzmechanismen führen, indem Phase II Enzyme wie z.B. Glutathion-S-Transferase induziert werden, welche reaktive BAP-Metabolite durch Konjugation entgiften können (Luch and Baird, 2010). Dieses wäre eine mögliche Erklärung für die hohe Toleranz von BAP in WT Zellen. Im Gegensatz zu BAP, zeigt CRY eine moderate zytotoxische Wirkung auf WT und AHR-KD Zellen neben einer moderaten CYP Aktivierung in WT Zellen. Da demnach der Metabolismus und eine mögliche AHR Aktivierung als Grund für die zytotoxische Wirkung ausgeschlossen werden kann, ist diese womöglich auf die Induktion von oxidativem Stress durch CRY zurückzuführen (Ali et al., 2011). DALP hingegen verursacht bereits in geringen Dosen eine starke Zytotoxizität in WT Zellen, während AHR-KD Zellen nicht in der Viabilität beeinflusst werden. Dementgegen steht eine geringe bis ausbleibende Induktion der CYP-Level in beiden Zelllinien, was auf eine geringe AHR Aktivierung durch DALP schließen lässt. Möglicherweise reichen im Falle von DALP die basalen CYP-Level in WT Zellen aus um DALP zu aktiven Metaboliten umzusetzen, welche darauf eine zytotoxische Wirkung entfalten. In murinen embryonalen Fibroblasten tragen aus DALP gebildete Diolepoxide zur Zytotoxizität bei (Yoon et al., 2004). Trotz ausbleibender CYP-Induktion nach DALP Exposition ist eine starke Bildung von DNA-Addukten nachweisbar (Topinka et al., 2008). In MCF-7 Zellen bewirkt ein AHR *knockout* eine 10.000-fache Reduktion des CYP1B1 Basallevels (Ahmed et al., 2014). Da CYP1B1 hauptsächlich verantwortlich für den Metabolismus von DALP ist (Luch et al., 1998), kann dies die fehlende Sensitivität der AHR-KD Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten von DALP erklären, welche in HaCaT WT Zellen bei geringen Konzentrationen stark ausgeprägt sind. Möglicherweise fungiert DALP aber auch als AHR Modulator und adressiert einen alternativen Signalweg unabhängig von der kanonischen AHR Aktivierung über XRE (Murray et al., 2010).

Betrachtet man allein die Effekte der drei untersuchten PAKs auf die Viabilität, sowie CYP1A1 und CYP1B1 Expression, so wird ihre distinkte Wirkweise sichtbar und der

Einsatz von BAP als Modellschubstanz für die gesamte Substanzklasse der PAKs erscheint fragwürdig.

4.1.2. Eingriff in biochemische Stoffwechselwege

Über eine zielgerichtete *Metabolomics* Studie werden in HaCaT Zellen die Konzentrationen von 166 endogenen Metaboliten (Aminosäuren, biogene Amine, Carnitine, Phospholipide, Sphingomyeline und Hexose) erhalten. Stark veränderte metabolische Profile in den drei verschiedenen Behandlungsgruppen werden in WT Zellen gezeigt. Dafür können die unterschiedlichen Wirkungen der drei PAKs auf den AHR verantwortlich sein. Aufgrund der stark induzierten CYP-Expression durch BAP und CRY haben bei diesen Substanzen wahrscheinlich die kanonische AHR Aktivierung und der Einfluss gebildeten PAK-Metabolite bei den metabolischen Veränderungen einen großen Einfluss. Nach DALP Behandlung bleibt die CYP-Induktion aus. Zu den starken metabolischen Veränderungen in WT Zellen im Vergleich zu AHR-KD Zellen kann daher eine nicht-kanonische AHR Aktivierung oder die Biotransformation von DALP zu reaktiven Intermediaten durch CYP-Enzyme auf Basallevel führen.

Auffällig ist die Verringerung der Aminosäure-Level in HaCaT WT Zellen. Insgesamt zeigen 15 Aminosäuren nach DALP Exposition verringerte Level, darunter sind drei (Alanin (Ala), Gln und Lysin (Lys)) auch nach BAP Exposition erniedrigt. Auch *alpha*-Aminoadipinsäure, eine Zwischenstufe in der Biosynthese von Lys, zeigt verringerte Level nach BAP und DALP Exposition. Diese Veränderung weisen auf einen Eingriff in den Energiestoffwechsel der Zellen hin. Möglicherweise weist der Citratzyklus eine verminderte Aktivität auf, welche zu einer verminderten Produktion von Aminosäuren und Zwischenstufen führt.

Betrachtet man die Änderungen der Lipidprofile, so zeigen die Acylcarnitin-Level in WT Zellen eine starke Erhöhung nach BAP und DALP Exposition. Langkettige Acyl-CoenzymAs (Acyl-CoAs) werden in Acylcarnitine umgewandelt, welche darauf aktiv durch die mitochondriale Membran im Austausch gegen freies Carnitin transportiert werden. Im Mitochondrium werden Acyl-CoAs der β -Oxidation zugeführt (Minnich et

al., 2001). Eine mögliche Inhibition der β -Oxidation durch PAKs wurde bereits für verschiedene Organismen postuliert (Carvalho and Lettieri, 2011; Lee et al., 2010; Westman et al., 2013). Daher ist eine Akkumulation der Acylcarnitine in mit BAP und DALP exponierten Zellen durch eine Hemmung des Fettsäureabbaus eine mögliche Erklärung für die erhöhten Level. Die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (CPT-1) ist in der mitochondrialen Membran lokalisiert und katalysiert den Austausch der Acyl-Gruppe des langkettigen Acyl-CoAs gegen Carnitin. Dieses Enzym zeigt in Rattenleber eine dreifache Erhöhung nach Exposition mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), was für eine vermehrte Produktion von Acylcarnitinen spricht (Fletcher et al., 2005; Forgacs et al., 2012). TCDD ist als potenter AHR Agonist, welcher nicht metabolisiert wird, bekannt. Die Erhöhung der Acylcarnitine ist daher neben der Hemmung der β -Oxidation möglicherweise durch eine AHR-abhängige CPT1-Induktion erklärbar. Der genaue Mechanismus des Einflusses von PAKs auf den Abbau von Acylcarnitinen ist bisher nicht bekannt. Als Folge verminderter β -Oxidation steht der Zelle weniger Acetyl-CoA zur Verfügung, welches nachfolgend nicht für den Citratzyklus bereitgestellt werden kann. Durch einen verminderten Citratzyklus kann es dann zu verminderten Aminosäure-Level kommen, da die Vorstufen nicht mehr ausreichend gebildet werden können.

Die Phospholipid Gruppen von Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und in der Regulation von Funktionen der Zelle, Signalwegen der Membran und Entzündungsprozessen involviert (Gault et al., 2011). Aufgrund ihrer Lipophilie können PAKs in die Zellmembran integrieren und biologische Funktionen der Membran beeinflussen (Tekpli et al., 2010), was die stark veränderten Phosphatidylcholin-Level in dieser Studie erklären kann. Die Aktivierung vom kanonischen AHR Signalweg kann mit den Phospholipid Veränderungen nach BAP und CRY in Verbindung gebracht werden, da entsprechende Veränderungen der Phosphatidylcholin-Zusammensetzung in AHR-KD Zellen nicht beobachtet werden. AHR Aktivierung hat einen Einfluss auf Zielgene des Lipidmetabolismus (z.B. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-*delta* und Lipin 1) (Kalkhof et al., 2015;

Michaelson et al., 2011). Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unbekannt. Das Phospholipid PCaa_C36:2, welches nach BAP und CRY Exposition nur in WT Zellen erhöht ist, wird in dieser Studie als potentieller Biomarker für kanonische AHR Aktivierung identifiziert. Erhöhte Sphingomyelin-Level resultieren aus BAP oder DALP Exposition in HaCaT WT Zellen. Dieses kann mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Sphingomyeline werden durch Sphingomyelinase zu Ceramiden hydrolysiert, welche darauf als *second messenger* Zytokine wie TNF α aktivieren und darüber apoptotische Signalwege anstoßen können (Wymann and Schneider, 2008).

4.1.3. Schlussfolgerung

In dieser Studie werden zum ersten Mal metabolomische Biomarker in HaCaT Zellen identifiziert, welche in Beziehung zur PAK-Exposition stehen. Darüber hinaus wird die distinkte Wirkweise der drei untersuchten PAKs auf den zellulären Stoffwechsel anhand von metabolomischen Veränderungen herausgestellt. Für die PAK Exposition und Karzinogenität wurden bereits in der Vergangenheit Biomarker postuliert. Darunter fällt das Ausmaß der CYP1A1 Induktion, jedoch wird in dieser und in anderen Studien die eingeschränkte Gültigkeit dieses Biomarkers gezeigt, da potente karzinogene PAKs nicht zwingend eine starke CYP1A1 Induktion auslösen (Billiard et al., 2008; Siddens et al., 2012). Die Biomarker der vorliegenden Arbeit aus dem Lipid- und Energiemetabolismus können als Ergänzung dienen und nach weiterer Absicherung möglicherweise in einem standardisierten Testsystem für die Risikobewertung in Betracht gezogen werden. In dieser Studie wurden zunächst als *proof of principle* Einzelsubstanzen untersucht. Da Interaktionen durch die simultane Exposition mit verschiedenen PAKs in Mischungen wahrscheinlich sind, sollten weitere Untersuchungen für PAK-Gemische angestrebt werden und veränderte Metabolitmuster verglichen werden, um additive oder synergistische Effekte herauszustellen.

4.2. Identifizierung von Biomarkern und mechanistische Einblicke nach Exposition mit Xenoestrogenen durch eine Kombination von Metabolomanalysen und zellulären Assays in MCF-7 Zellen

In der zweiten Studie der vorliegenden Arbeit werden Antworten auf drei Fragestellungen dargelegt. Als Erstes wird ein estrogenes Metabolitmuster aus den betrachteten 166 Metaboliten herausgearbeitet. Zweitens, erweist Cd^{2+} in Ko-Exposition vernachlässigbare Effekte, sodass sich in dieser Studie die Zweifel an der hormonellen Aktivität dieses Schwermetalls erhärten. Als Drittes wird die Aminosäure Pro als estrogenen Biomarker identifiziert und verifiziert. Durch weiteres mechanistisches Vorgehen kann Pro mit $\text{ER}\alpha$ Aktivierung und proliferativen Effekten in Verbindung gebracht werden.

Über den zielgerichteten *Metabolomics* Ansatz und anschließende statistische Analyse können elf Metabolite (vier Aminosäuren und sieben Phospholipide) identifiziert werden, welche nach E2 und BPA Exposition signifikant in die gleiche Richtung verändert sind. Dieses Metabolitmuster spiegelt daher die estrogenen Wirkung der beiden Substanzen wider. Besonders starke Veränderungen gibt es im Bereich der Aminosäuren (z.B. Gln, Histidin (His), Leucin (Leu) und Pro), welche alle erhöhte Level zeigen. Diese Erhöhung weist auf eine verstärkte Proteinbiosynthese hin, welche auch von Maertens *et al.* als Hauptangriffspunkt nach E2 Behandlung in MCF-7 Zellen identifiziert wird (Maertens et al., 2016). In proliferierenden Zellen ist die Aufnahme, Synthese und der Einbau von Bausteinen wie Aminosäuren essentiell für das Zellwachstum. Da diese Bausteine für die Zellen bedeutender sein können als die Energiegewinnung durch Adenosintriphosphat Produktion, verlagern proliferierende Krebszellen ihren Metabolismus von der oxidativen Phosphorylierung auf anaeroben Stoffwechsel- ein Phänomen welches als Warburg Effekt bekannt ist (Vander Heiden et al., 2009). Die starke Aminosäure-Level-Erhöhung kann daher durch den Warburg Effekt bedingt sein. Vereinfacht dargestellt wird hierbei in den Zellen verstärkt Glykolyse betrieben, welche einerseits Pyruvat für den Citratzyklus

liefert und andererseits Glucose-6-phosphat für den Pentosephosphatweg bereitstellt. Über den Citratzyklus werden dann Bausteine für die Lipidsynthese, sowie Aminosäure-Synthese gewonnen und über den Pentosephosphatweg wird die Nukleotidsynthese unterstützt. Ein verstärkter Transport von Glukose und Gln, sowie eine erhöhte Laktat-Produktion und eine erhöhte Aktivität des Pentosephosphatwegs ist in MCF-7 Zellen nach Stimulation mit E2 nachweisbar (Forbes et al., 2006).

4.2.1. Ko-Exposition von BPA oder E2 mit dem Schwermetall Cd²⁺

Die potentielle endokrine Wirkung von Cd²⁺ wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Silva et al., 2012). *In vivo* kann eine durch Cd²⁺ induzierte Proliferation estrogensensitiver Gewebe gezeigt werden (Johnson et al., 2003). In transgenen Mäusen, welche ein ERE-Luziferase-Konstrukt tragen, wirkt Cd²⁺ jedoch unabhängig von der ERE-Aktivierung (Ali et al., 2015). Bisher publizierte Arbeiten zur estrogenen Wirkung von Cd²⁺ *in vitro* sind ebenfalls kontrovers. Choe *et al.* berichten sowohl über die Aktivierung eines ERE-kontrollierten Reportergens, als auch über eine erhöhte Zellproliferation bei nanomolaren Cd²⁺ Konzentrationen (Choe et al., 2003). Andere Arbeitsgruppen können diese Ergebnisse jedoch weder im *E-Screen* noch in hefebasierten Reporterassays reproduzieren (Silva et al., 2006). Frühe *Northern-Blot* Experimente dagegen zeigen die Hochregulation endogener estrogenregulierter Gene wie *PGR* und *TFF1* durch mikromolare Cd²⁺-Konzentrationen in MCF-7 Zellen (Garcia-Morales et al., 1994). In einer weiteren Studie zeigt Cd²⁺ allein keinen Effekt auf die Aktivierung des ERs, potenziert aber bei Ko-Exposition mit E2 die Antwort eines hefebasierten ER-Assays um das Zehnfache (Denier et al., 2009). Mechanistische Studien in Brustkrebszelllinien ergeben zudem, dass Cd²⁺ eine Aktivierung der *Mitogen Activated Protein* (MAP)-Kinase und von Protein Kinase B (Akt) bewirkt, was wiederum eine Phosphorylierung des ER α zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Interaktion mit dem Protein Jun des Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Komplexes an estrogensensitiven Promotoren (Siewit et al., 2010).

Die experimentellen Daten dieser Studie deuten ebenfalls auf einen indirekten Wirkmechanismus von Cd^{2+} hin, der unabhängig von einer klassischen $\text{ER}\alpha$ -Aktivierung ist. Weder im Proliferationsassay, noch im HeLa9903-Reporterassay oder bei der Expression ER-regulierter Gene können Effekte mit Cd^{2+} alleine oder mit Cd^{2+} in Kombination mit E2 beobachtet werden. Im Metabolom kann hingegen nach Ko-Exposition mit Cd^{2+} eine Modulation der veränderten Metabolit-Level nach BPA und E2 Exposition ermittelt werden. Cd^{2+} Ko-Exposition zeigt sowohl verstärkende als auch abschwächende Effekte auf die Metabolit-Level, welche vor allem Phospholipide betreffen. Welche Bedeutung diese Einflüsse von Cd^{2+} haben erfordert weitere Studien. Auch die Aminosäure Leu zeigt eine Erhöhung um 2 Gruppenstufen in Ko-Exposition von Cd^{2+} mit E2, nicht jedoch mit BPA. Dies deutet darauf hin, dass die Art des simultanen estrogenen Stimulus bei der Interaktion mit Cd^{2+} eine Rolle spielt.

4.2.2. Mechanistische Untersuchung des estrogenen Biomarkers Pro

Die Aminosäure Pro zeigt die stärkste statistisch signifikante Metabolit-Level-Veränderung nach E2, sowie BPA Exposition. Eine konzentrationsabhängige Erhöhung kann über eine komplementäre Methode nachgewiesen werden und zeigt eine Korrelation mit den Ergebnissen des *E-Screens*. Dieses bestätigt Pro als Biomarker für estrogene Exposition und Zellproliferation. Durch siRNA *knockdown* von $\text{ER}\alpha$ können in weiterführenden Experimenten die Pro-Level auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle zurückgeführt werden. Der gleiche Effekt wird durch den Einsatz zwei verschiedener $\text{ER}\alpha$ Inhibitoren erreicht. Die Abhängigkeit des Pro-Anstiegs von $\text{ER}\alpha$ vermittelten Effekten wird hierdurch bestätigt. In Burkitt-Lymphom und anderen Krebszellen wird die Biosynthese von Pro, sowie veränderter zellulärer Metabolismus mit der Aktivierung des onkogenen Transkriptionsfaktors MYC in Verbindung gebracht (Liu et al., 2012; Phang et al., 2012). In MCF-7 Zellen ist die Expression von MYC durch E2 induzierbar (Dubik and Shiu, 1988; Wang et al., 2011). Aufgrund dieser Erkenntnisse aus der Literatur wurden weiterführende

mechanistische Untersuchungen durchgeführt. MYC stellt ein Zielgen von ER α dar, und wurde auf mRNA und Proteinebene über siRNA *knockdown* Experimente untersucht. Die Pro-Level sind nach MYC *knockdown* signifikant reduziert, was für eine partielle Beteiligung von MYC an der Pro-Level-Erhöhung spricht. Eine Induktion von MYC nach E2 Exposition kann hierdurch bestätigt werden. Pro kann aus Gln über Glutamat (Glu) und Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) biosynthetisiert werden (Abbildung 4). Hierbei sind einige Enzyme involviert, die über MYC kontrolliert werden, wie Glutaminase (GLS1), Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat-Synthase (P5CS) und P5C-Reduktase (PYCR1). Außerdem werden Enzyme wie Pro-Dehydrogenase (POX/PROD) und P5C-Dehydrogenase (P5CDH), die zur Umkehr dieses Weges führen durch MYC erniedrigt (Phang et al., 2012).

Der von Phang *et al.* postulierte Signalweg kann in MCF-7 Zellen nur bedingt bestätigt werden. Ein unvollständiger MYC *knockdown* ist möglicherweise hierfür verantwortlich. Eine Erhöhung der Gln-Level, sowie der Expression des Gln-Membrantransporters *SLC1A5*, welcher die Aufnahme von Gln aus dem Medium über die Zellmembran ermöglicht, kann in dieser Studie jedoch nachgewiesen werden. Außerdem wird auf Proteinebene eine starke GLS1 Erhöhung nachgewiesen, welche nach MYC-*knockdown* vermindert ist. Diese Veränderungen erklären die Metabolit-Level-Erhöhung von Gln nach E2 und BPA Exposition. Die vermehrte Aufnahme von Gln fördert die Bildung von Nukleotiden und aus Gln gebildetes Glu kann weiter zu α -Ketoglutarat (α -KG) verstoffwechselt werden, welches in den Citratzyklus eingeht. Bei der Biosynthese von Pro ausgehend von Gln oder Glu, wird der für die Glykolyse wichtige Kofaktor NAD⁺ frei. Diese Stoffwechselwege liefern also wichtige zelluläre Bausteine und sind daher für proliferierende Zellen besonders vorteilhaft. Eine leichte MYC-vermittelte Verminderung von P5CDH kann ebenfalls gezeigt werden. Jedoch kann keine Verminderung von PYCR1 nach MYC-*knockdown* bestätigt werden. PYCR1 wurde allerdings in einer anderen Studie als notwendiges Gen in der Brustkrebsentstehung identifiziert (Possemato et al., 2011), was die Bedeutung dieses Enzyms für die Zellproliferation in Brustkrebszellen untermauert.

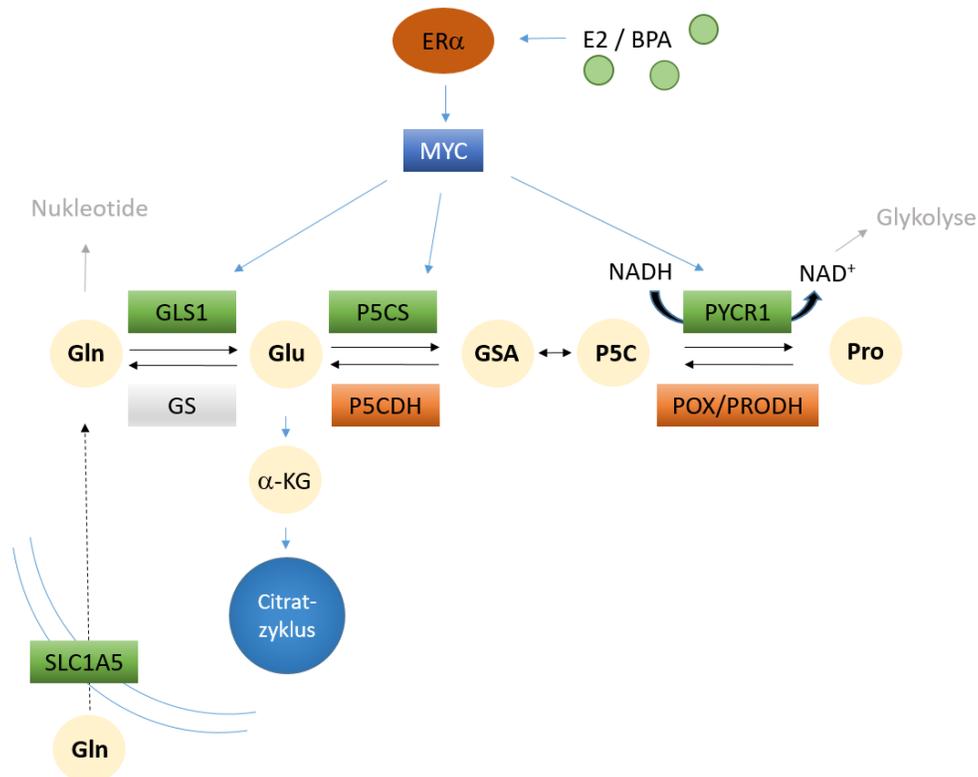


Abbildung 4: Pro Biosynthese und Degradierung (Phang et al., 2015). GLS1 katalysiert die Transformation von Gln zu Glu welches über P5CS weiter zu GSA umgesetzt und zu P5C umgewandelt wird. Aus P5C wird über PYCR1 schließlich Pro gebildet. Hierbei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert welches im Anschluss in die Glykolyse einfließen kann. Umgekehrt kann Pro wieder zu Glu über POX/PRODH und P5CDH abgebaut werden. Der Gln-Transporter SLC1A5 ist für das Einschleusen von Gln in die Zelle verantwortlich. Glu kann außerdem für die Synthese von Nukleotiden verwendet werden. Glu kann weiter zu α -KG umgesetzt werden, welches wiederum in den Citratzyklus eingehen kann. Farbgebung: Grün hinterlegte Enzyme (GLS1, P5CS und PYCR1), sowie der Membrantransporter SLC1A5 begünstigen die Pro Biosynthese und werden durch MYC induziert. Rot hinterlegte Enzyme (P5CDH und POX/PRODH) begünstigen den Pro Abbau und werden durch MYC gehemmt. Abkürzungen: Glutaminase (GLS1), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), Glutamin Synthetase (GS), Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat-Synthase (P5CS), Glutamatsemialdehyd (GSA), Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C), P5C-Reduktase 1 (PYCR1), Prolin (Pro), Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert NADH, oxidiert NAD⁺), Pro-Dehydrogenase (POX/PRODH), P5C-Dehydrogenase (P5CDH), α -Ketoglutarat (α -KG).

4.2.3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie werden zum ersten Mal zelluläre Effekte von E2 und BPA, sowie kombinierte Effekte dieser (Xeno)estrogene mit Cd²⁺ mittels eines *Metabolomics* Ansatz aufgeklärt. Die Ergebnisse liefern nicht nur eine Gruppe von potenziellen zellulären Biomarkern für estrogene Effekte, sondern auch Einblicke in die zugrundeliegenden Stoffwechselwege und Mechanismen. Die detektierten metabolomischen Veränderungen eröffnen auch neue Fragestellungen, die über die Biomarker Identifizierung hinausgehen. Die Bedeutung von Pro und dem Pro-Metabolismus ist in der Literatur noch wenig beschrieben. Kürzlich ist Pro als mögliches Supplement für die Behandlung von menopausalen Beschwerden postuliert worden und eine Proliferationserhöhung konnte durch Pro Applikation in MCF-7 Zellen gezeigt werden (Nam et al., 2016). Eine Beziehung zwischen der Regulation des Pro-Metabolismus und der Krebsentstehung stellt die Arbeitsgruppe Phang *et al.* her (Phang et al., 2015). In dieser Arbeit wird der durch den Transkriptionsfaktor MYC beeinflusste Pro-Metabolismus zum ersten Mal mit der Wirkung von (Xeno)estrogenen in Verbindung gebracht. Diese Studie zeigt das hohe Potenzial von *Metabolomics* Studien, wenn diese mit komplementären Methoden kombiniert werden. Identifizierte Anhaltspunkte über zugrundeliegende Mechanismen können hierdurch gezielt weiterführend untersucht werden.

4.3. Identifizierung von Lipidbiomarkern für die Ko-Exposition subtoxischer Dosen von BAP und Cd²⁺: der toxikologische „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“

In der Risikobewertung von Umweltchemikalien sind Ko-Expositionsszenarien schwer abschätzbar. Testungen für Einzelsubstanzen können nur additives Verhalten von Substanzmischungen in Betracht ziehen. Hingegen werden mögliche synergistische oder antagonistische Interaktionen mit zellulären Zielstrukturen eines Organismus nicht ausreichend adressiert. Um das Gesundheitsrisiko von Substanzmischungen bewerten zu können und sichere Grenzwerte für diese zu ermitteln, bedarf es neuer Testsysteme für Ko-Expositionsszenarien. In der vorliegenden Studie wird ein neuer Ansatz für ein Testsystem für Ko-Expositionen von PAKs und Schwermetallen vorgestellt, welches auf metabolomischen Biomarkern basiert und additive, synergistische und antagonistische Effekte darstellen kann. Über gezielte Inhibitionen von Schritten in toxikologischen Signalwegen und Evaluierung des Einflusses auf das relevante Metabolit-Muster wird zusätzlich eine mechanistische Aussage getroffen.

4.3.1. Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺

Nach Anwendung eines zielgerichteten *Metabolomics* Ansatzes werden als Kernergebnis der Studie mittels multivariater Statistik zunächst 18 Lipide (neun Phosphatidylcholine und zwei Lysophosphatidylcholine, sowie sieben Sphingomyeline) als Biomarker für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ identifiziert. Visualisierung der Lipid-Level-Veränderungen für die verschiedenen Behandlungsgruppen über ein Farbmodell weisen auf synergistische Effekte der beiden Substanzen in Kombination hin. So zeigen zwei Biomarker, ein Sphingomyelin und ein Lysophosphatidylcholin, nur nach Ko-Exposition erhöhte Metabolit-Level im Vergleich zur Kontrolle und weitere elf der 18 Biomarker werden bei BAP und Cd²⁺ Exposition weiter erhöht als mit BAP allein. Für Cd²⁺ wurde bewusst eine niedrige Konzentration gewählt, welche bei alleiniger Applikation des Schwermetalls keine

metabolomischen Veränderungen hervorruft. Hierdurch wird die eindeutige Erfassung von synergistischen Effekten gewährleistet. Hinweise auf Kombinations-Effekte von Cd^{2+} mit AHR Liganden inkl. BAP, besonders auf AHR abhängige Regulation, welche auf synergistische Effekte hindeuten finden sich in der Literatur (Elbekai and El-Kadi, 2004; Vakharia et al., 2001). In Hepa1c1c7 Zellen wird durch Ko-Exposition von BAP und Cd^{2+} die Induktion von Glutathion-S-Transferase Level potenziert und Hämoxigenase-1 Level erhöht (Elbekai and El-Kadi, 2004). Darüber hinaus wird AHR Aktivierung mit dem Lipidmetabolismus, besonders der Aktivierung von Fettsäuretransport-Proteinen und einer Absenkung der Fettsäureoxidation in Verbindung gebracht (Lee et al., 2010). Da Metabolit-Level-Veränderung nach BAP, sowie BAP und Cd^{2+} Exposition in MCF-7AHR₂₀₀ Zellen ausbleiben, sind die identifizierten 18 Lipidbiomarker auch Indikatoren für AHR Aktivierung. Dieses bestätigt die bestehende Verbindung zwischen AHR und Lipid-Level-Erhöhungen. Auch Cd^{2+} kann einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus haben, z.B. zeigen Wistar Ratten nach chronischer Cd^{2+} Exposition durch erhöhte CTP: Phosphocholin-Cytidyltransferase (CCT) auch erhöhte Phospholipid-Level (Alvarez et al., 2007). CCT katalysiert einen Hauptschritt in der *de novo* Synthese von Phosphatidylcholinen. Eine Erhöhung der Phospholipid-Level nach BAP und Cd^{2+} Exposition, aber nicht nach BAP allein, kann aus den unterschiedlichen Angriffspunkten der beiden Substanzen in der Regulation des Lipidmetabolismus resultieren. Erhöhte Level von Lysophosphatidylcholinen weisen auf die Aktivierung von regulatorischen Signalwegen in der DNA Synthese hin (Chai et al., 2000), welche durch die Entstehung von DNA-schädigenden BAP Metaboliten ausgelöst werden kann.

Interessanterweise wird für drei der in MCF-7 Zellen identifizierten Biomarker (PCaa_C34:1, PCaa_C36:1 und PCaa_C36:2) ebenfalls eine signifikante Erhöhung in Blutplasma von Zigarettenrauchern im Vergleich zu Nichtrauchern detektiert (Wang-Sattler et al., 2008). Da BAP und Cd^{2+} Bestandteile des Zigarettenrauches sind,

weisen diese Lipide ein hohes Potenzial für die Anwendung als Biomarker für die Exposition von karzinogenen PAKs in Verbindung mit Schwermetallen auf.

Als beeinflusster Hauptsignalweg für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ in MCF-7 Zellen wird eine Aktivierung der HER2 Signalkaskade identifiziert. Die Regulation des HER2, ein Mitglied der EGFR Familie, beeinflusst Apoptose und Krebsentstehung (Liang et al., 2003). Da 15 von 18 Biomarkern durch die Anwendung des PC-PLC Inhibitors D609 auf Kontrollniveau zurückgeführt werden, wird PC-PLC Aktivierung ebenfalls als Schlüsselmechanismus für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ angenommen. Der starke Anstieg der Sphingomyelin-Level nach BAP, sowie BAP und Cd²⁺ Exposition kann mit einer erhöhten Aktivität von Sphingomyelin Synthase zusammenhängen, welche mit erhöhter PC-PLC Aktivität korreliert (Luberto and Hannun, 1998). Sphingomyelin Synthase ist für die Umwandlung von Ceramiden in Sphingomyeline verantwortlich, und kann folglich zu erhöhten Sphingomyelin-Leveln führen, wie sie in dieser Studie detektiert wurden. Nach erfolgter Aktivierung transloziert PC-PLC zur Zellmembran und ko-lokalisiert mit HER2 (Paris et al., 2010). HER2 Monomere liegen in den Lysosomen der Zellen vor. In Hepa1c1c7 und Tao Zellen zeigte erhöhte AHR Rezeptor Aktivität einen signifikanten Einfluss auf die Permeabilität von Lysosomen (Caruso et al., 2004). Außerdem reichern sich PAKs nach Aufnahme in die Zellen in den Lysosomen an (Allison and Mallucci, 1964). PC-PLC stabilisiert HER2 beim Einbau in die Plasmamembran der Zellen und verursacht Heterodimer-Bildung von HER2 mit anderen Mitgliedern der EGFR- Familie. Die hierdurch aktivierte Signalkaskade trägt zur Proliferation von Krebszellen im Menschen bei (Hartman et al., 2013). Wird PC-PLC hingegen inhibiert, resultiert Internalisierung von HER2 und erhöhter Abbau in den Lysosomen, somit wird der HER2 an der Zelloberfläche erniedrigt (Paris et al., 2010).

Basierend auf diesen Erkenntnissen aus der Literatur und den Ergebnissen der Studie, könnten BAP und Cd²⁺ auf folgende Weise zusammenwirken: BAP führt zu vermehrter PC-PLC Aktivierung durch Induktion der Translokation zur Zellmembran über erhöhte Permeabilität der Lysosomen. PC-PLC fördert darauf die Heterodimer-

Bildung von HER2 und anderen EGFRs. Cd²⁺ kann dann zur EGFR Aktivierung beitragen (Carpenter and Jiang, 2013) und die resultierenden Effekte verstärken.

4.3.2. „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“

Aus den im Farbmodell visualisierten Ergebnissen der veränderten Lipidbiomarker nach Exposition mit Cd²⁺, BAP, oder BAP und Cd²⁺ jeweils ohne und mit Zugabe von Inhibitoren wurde ein „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ abgeleitet. Dieser stellt ein Testsystem dar, welches dazu dienen kann die proliferative und karzinogene Potenz von Umweltchemikalien in Mischexposition zu identifizieren. Hierbei wird verglichen, ob Veränderungen im Metabolom von MCF-7 Zellen mit denen von BAP und Cd²⁺ ausgelöst und den zugrundeliegenden Mechanismen übereinstimmen. BAP bleibt im Ko-Expositionsszenario als Repräsentant der PAKs erhalten und es wird eine neue Testsubstanz, z.B. ein anderes Schwermetall ausgewählt. Die Konzentration der Testsubstanz sollte so gewählt werden, dass sie allein appliziert keine metabolomischen Veränderungen auslöst. Anschließend werden die Konzentrationen der 18 Lipidbiomarker welche für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ identifiziert wurden im Hochdurchsatzverfahren gemessen und es folgt eine automatisierte Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Von den 18 Lipidbiomarker wurden in dieser Studie 15 mit PC-PLC Aktivierung assoziiert und vier mit HER2 vermittelter c-Fos und MKP-1 Aktivierung. Unter den vier Biomarkern, welche auf c-Fos und MKP-1 Inhibition reagieren, befinden sich auch jene, welche nur in der Ko-Exposition eine Erhöhung zeigten. Daher scheint dieser Schritt für die kombinatorische und synergistische Wirkung von BAP und Cd²⁺ besonders wichtig zu sein. Der „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ beinhaltet somit drei Stufen: In der ersten Stufe wird das Metabolitmuster der vier Biomarker welche auf HER2 vermittelte c-Fos und MKP-1 Inhibition reagieren verglichen. Unterscheiden sich die Veränderung vom BAP und Cd²⁺ Ansatz, wird kein additiver oder synergistischer Effekt auf den HER2 Signalweg für die Testsubstanz angenommen und der Test endet an diesem Punkt. Zeigt das Muster jedoch eine identische Veränderung werden automatisch weitere elf Lipidbiomarker betrachtet welche auf PC-PLC Inhibition reagieren. Stimmt das

Muster in dieser Stufe nicht überein, deutet das auf eine Aktivierung von ausschließlich c-Fos und MKP-1 hin, nicht aber PC-PLC. Zeigt sich auch in diesem Schritt eine Übereinstimmung, wird direkt zur dritten Stufe weitergeleitet, in der die verbleibenden drei Metabolite betrachtet werden. Gibt es keine Übereinstimmung, kann zwar von einer c-Fos, MKP-1 und PC-PLC Aktivierung ausgegangen werden, aber nicht von einem additiven oder synergistischen Effekt vergleichbar zur BAP und Cd²⁺ Ko-Exposition. In einer automatisch kreierten Tabelle können die Ergebnisse des „Kaskaden-Biomarker-Ansatzes“ auf einfache und schnelle Weise zugänglich gemacht werden. Ist das komplette Metabolitmuster im beschriebenen Testsystem vergleichbar, wird das Ergebnis als positiv bewertet und für die Testsubstanz werden synergistische Effekte im Hinblick auf karzinogene Potenz und Proliferation im Ko-Expositionsszenario mit BAP bzw. PAKs vermerkt.

4.3.3. Schlussfolgerung

Der „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ welcher in dieser Arbeit exemplarisch für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ präsentiert wird, stellt ein neues Konzept dar, welches die Möglichkeit bietet kombinatorische Wirkungen von zumindest binären Substanzmischungen auf Basis eines identifizierten Mechanismus zu erfassen. Besonders vorteilhaft an diesem Ansatz ist die Reduktion auf eine überschaubare Anzahl an Metaboliten, welche schnell und kostenarm analysiert, sowie automatisch ausgewertet werden kann. In systembiologischen Ansätzen für die *omics* Methoden verwendet werden, stellt die aufwändige Datenanalyse und Interpretation oft ein Engpass dar, welcher somit umgangen werden kann. Für die Anwendung in der Risikobewertung ist notwendig die Spezifität der identifizierten Biomarker, sowie des postulierten Mechanismus, weitergehend abzusichern. Darauf kann eine Validierung des Testsystems folgen. Ist dies möglich, hat der „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“, welcher ausdehnbar auf verschiedenste Mechanismen ist, ein sehr großes Potenzial für die Implementierung in der Risikobewertung von Substanzmischungen.

5. Übergreifende Interpretation und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden neue Erkenntnisse über den Einfluss der toxikologisch relevanten verbrauchernahen Chemikalien BAP, CRY, DALP, BPA und Cd^{2+} auf den zellulären Stoffwechsel gewonnen und potentielle Biomarker identifiziert. Die distinkte Wirkweise der untersuchten Substanzen spiegelt sich eindrucksvoll in den unterschiedlichen Signaturen, welche diese im Metabolom hinterlassen, wider. Während PAK-Exposition in HaCaT Zellen u.a. eine Erniedrigung der Aminosäure-Level bewirkt, verursachen die (Xeno)estrogene E2 und BPA eine starke Erhöhung dieser. Erniedrigte Aminosäure-Level in Kombination mit erhöhten Acylcarnitin-Leveln lassen bei BAP und DALP auf einen gestörten Energiemetabolismus schließen. Die starke Erhöhung der Aminosäuren nach E2 und BPA Exposition wird mit der Proteinbiosynthese, welche in proliferierenden Zellen vermehrt stattfindet, assoziiert. Erhöhte Level an Phosphatidylcholinen nach BAP Exposition können in konsistenter Weise sowohl in HaCaT, als auch in MCF-7 Zellen nachgewiesen und in beiden Zelllinien mit AHR Aktivierung assoziiert werden. Während die Kombination des Xenohormons BPA mit dem Schwermetall Cd^{2+} nur einen leicht modulierenden Effekt bewirkt, verursacht die Ko-Exposition des PAKs BAP mit Cd^{2+} synergistische Effekte im Metabolitmuster.

Bei der Interpretation von metabolomischen Effekten werden häufig die Hauptsignalwege des biochemischen Stoffwechsels wie Citratzyklus, Glykolyse oder β -Oxidation herangezogen (García-Cañaveras et al., 2011; Gurbani et al., 2013; Jain et al., 2012; Ruiz-Aracama et al., 2011). Es stellt sich bei Metabolit-Level-Veränderungen im Allgemeinen die Frage, ob es sich bei diesen um einen direkten Einfluss auf einen Stoffwechselweg handelt, oder ob diese indirekt, als Folge zellulärer Effekte verursacht werden. Zudem müssen Metabolit-Level-Veränderungen nicht zwingend auf adverse Effekte hinweisen. Dies erschwert die Integration von metabolomischen Daten für die Risikobewertung immens. Ein regulatorisches Werkzeug, welches dazu dient mechanistische, alternative Daten in

die Risikobewertung toxikologisch relevanter Chemikalien zu integrieren, stellt das *Adverse Outcome Pathway* (AOP) Konzept dar (Ankley et al., 2010; OECD, 2013). Nach dem AOP Konzept steht am Anfang eines toxischen Signalwegs ein auslösendes molekulares Schlüsselereignis (z.B. Bindung eines Liganden an den AHR). Diesem Ereignis nachgeordnete Effekte (z.B. CYP-Enzyminduktion) komplettieren dann die zelluläre Antwort. Ein toxischer Signalweg führt bei ausreichender Störung, durch z.B. Chemikalien, zu einem adversen gesundheitlichen Effekt des gesamten Organismus. Da toxische Signalwege auf zellulärer Ebene stattfinden, ist ihre Untersuchung *in vitro* möglich. Allerdings steht im Fokus der Risikobewertung die finale adverse Wirkung, somit ist es wichtig den Zusammenhang zwischen dem toxischen Signalweg *in vitro* und dem adversen Effekt zu kennen. *In vitro* Testsysteme, welche diese toxischen Signalwege adressieren, können dann als mechanistischer Endpunkt gelten. Chemikalien können allerdings verschiedene molekulare Schlüsselereignisse auslösen. Neben der AHR Aktivierung bewirken genotoxische PAKs eine DNA-Schädigung. Das auslösende molekulare Ereignis stellt hier die Bindung der Chemikalie, oder deren Metabolite an die DNA dar. In der vorliegenden Arbeit konnten bereits Metabolit-Level-Veränderungen mit einer AHR Aktivierung assoziiert werden. Im Weiteren sollten Metabolit-Level, welche durch eine mögliche DNA-Schädigung ausgelöst werden von diesen abgegrenzt werden. Über den Einsatz von Inhibitoren für die entsprechenden Signalwege könnten die metabolomischen Veränderungen, ähnlich wie im dritten Teil dieser Arbeit dargestellt, auf mechanistische Weise zugeordnet werden. Denkbar wäre eine Untersuchung des Einflusses von wichtigen Regulatoren der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung, wie z.B. DNA abhängige Proteinkinase, sowie Zellzyklus Checkpoint Kinasen und schließlich die p53 Aktivierung auf die Metabolit-Level (Wink et al., 2014). Darüber hinaus sollte Art und Ausmaß der Biotransformation der verschiedenen PAKs in HaCaT Zellen, sowie der DNA-Addukt-Bildung erfasst werden. Diese Information würde bei der Unterscheidung von Metabolismus-abhängigen und unabhängigen Effekten auf die Biomarker Sets helfen. Wink *et al.* postulierten ein

prädiktives reporter-genbasiertes, bildgebendes Hochdurchsatz-Verfahren, um Zellstress auslösenden Schlüsselsignalwege, wie oxidativer Stress (Nrf2 vermittelt), Entzündungsprozesse (RelA vermittelt) oder DNA-Schädigung (p53 vermittelt) zu erfassen (Wink et al., 2014). Metabolomische Testsysteme, wie der in dieser Arbeit dargestellte „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“, können durch den Einsatz von Inhibitoren und ggf. siRNA in ähnlicher Weise eingesetzt werden, um eine tiefgehende mechanistische Aussage über die Effekte einer Substanz, oder Substanzmischung, zu erlangen. Basierend auf dem bekannten toxischen Mechanismus kann dann mit spezifischen und verlässlichen Biomarkern gearbeitet werden. Für die Risikobewertung von Xenoestrogenen wie BPA stellt ein relevanter adverser Effekt der Einfluss auf die Reproduktion eines Organismus dar. Die ER α -Bindung durch den Liganden BPA stellt hier auf zellulärer Ebene das molekulare Schlüsselereignis dar, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. Die resultierende Proliferation, als zelluläre Antwort auf dieses Ereignis, konnte erstmals mit dem neu identifizierten Biomarker Pro in Verbindung gebracht werden.

Neben dem mechanistischen Verständnis sollte ein genaueres Verständnis der internen Dosis angestrebt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit von Studien zu erzielen. Als Ergänzung zum AOP-Konzept haben Teeguarden *et al.* kürzlich ein *Aggregate Exposure Pathway* (AEP) Konzept veröffentlicht, um Expositionsdaten besser einzubeziehen (Teeguarden et al., 2016). Hierbei werden Expositionsquellen, Expositionsmedien, externe, sowie interne Expositionen und biokinetische Prozesse betrachtet, welche schließlich zum Zielexpositionsort für die jeweilige Chemikalie führen. Ziel dieses Konzepts ist die Vorhersage von Konzentrationen im Serum und Gewebe. Das nachfolgende auslösende Schlüsselereignis ist dann der Abschluss des AEP und der Startpunkt des AOP Konzepts. Ein Teil des AEP Netzwerks wird z.B. für BPA wie folgt abgebildet: Eine Expositionsquelle stellen Epoxidharzbeschichtungen in Konservendosen dar, das Expositionsmedium ist in diesem Fall das konservierte Lebensmittel, welches oral (externe Exposition) aufgenommen wird, zu Serumkonzentrationen (interne Exposition) führt und somit das Zielgewebe erreicht.

Diese Analyse wird für alle Expositionsquellen strukturiert durchgegangen (z.B. auch für BPA in Thermopapier) und durch andere Chemikalien, welche das gleiche molekulare Schlüsselereignis (ER-Rezeptorbindung) auslösen, kombiniert. In dieser Arbeit wurden im Falle der PAKs bewusst geringe Konzentrationen eingesetzt, welche keine zytotoxischen Effekte in den studierten Zellen auslösen. Für BPA und E2 wurden mit Konzentrationen gearbeitet, welche eine maximale Rezeptor-Aktivierung bewirken, um die metabolomischen Veränderungen mit dieser assoziieren zu können. In weiteren Studien sollte eine detailliertere Betrachtung der zu erwartenden Konzentrationen in den Zielzellen anhand von Expositionsdaten durchgeführt werden und die Untersuchungen auf verschiedene Dosierungen ausgeweitet werden.

Über den in dieser Arbeit eingesetzten zielgerichteten *Metabolomics* Ansatz war es möglich, quantitative und reproduzierbare Daten von einer großen Gruppe endogener Metabolite zu gewinnen. Um eine maximale mechanistische Antwort zu erlangen, sollte eine Reihe von zielgerichteten Methoden, welche sich spezifisch auf bestimmte Stoffwechselwege beziehen kombiniert werden. Dieses Vorgehen bietet die Möglichkeit unterschiedliche Extraktionsmethoden für bestimmte Metabolit-Klassen anwenden zu können. Beispielsweise für die Analyse von Hormonen, welche in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, könnte so ein weiterer Aufkonzentrierungsschritt eingesetzt werden. Die analytische Methode kann dann auf die jeweilige Metabolitklasse optimiert werden und resultierende Daten können anschließend über ein automatisiertes Verfahren ausgewertet werden. Somit wäre es möglich ein ganzes Netzwerk von Stoffwechselwegen abzubilden und für die weiterführende mechanistische Untersuchung, Biomarker Identifizierung, oder auch die Pflege von Metabolomdatenbanken zu Nutzen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde *Metabolomics* mit zellulären Methoden kombiniert, um die Entwicklung neuer, auf toxischen Mechanismen basierender, *in vitro* Testmethoden für die Risikobewertung von verbrauchernahen Chemikalien, insbesondere von Substanzmischungen, voranzutreiben.

Im ersten Teil wurden erstmals die Wirkungen drei verschiedener PAKs CRY, BAP und DALP unterschiedlicher karzinogener Potenz und AHR Bindungsaffinität auf das Metabolom in HaCaT Zellen untersucht. Unterschiede in der CYP-Expression, sowie Viabilität exponierter Zellen zeigten die differentielle AHR-abhängige Wirkweise der drei PAKs. Über einen zielgerichteten *Metabolomics* Ansatz wurden 24 Metabolite als Biomarker identifiziert, welche die distinkte Wirkweise der einzelnen Verbindungen der Substanzgruppe der PAKs weitergehend herausstellten. Einflüsse auf den Energiestoffwechsel und den Lipidmetabolismus wurden hierbei abgeleitet.

Im zweiten Teil wurden Effekte von E2, BPA und Cd²⁺ auf MCF-7 Zellen untersucht. Erstmals wurde eine Gruppe von elf Biomarkern identifiziert, welche nach E2 sowie nach BPA Exposition reguliert und daher mit estrogenen Effekten assoziiert wurde. Ko-Expositionsexperimente mit E2 oder BPA und dem Schwermetall Cd²⁺ zeigten lediglich einen geringen modulierenden Einfluss von Cd²⁺ auf das veränderte Metabolitmuster. Zelluläre Testmethoden, wie Expressionsexperimente zu ER-Zielgenen, zeigten keine Effekte durch Cd²⁺ in der Ko-Exposition. Die Aminosäure Pro wurde als estrogener Biomarker identifiziert. Eine Korrelation des Anstiegs der Pro-Konzentrationen mit Proliferationseffekten wurde bestätigt. Weiterführende Experimente zeigten die Abhängigkeit der Pro-Level-Erhöhung von ER α . Außerdem wurde ein Einfluss des Onkogens MYC auf den betreffenden Signalweg ermittelt.

Im dritten Teil wurden 18 Lipidbiomarker in MCF-7 Zellen für die Ko-Exposition von BAP und Cd²⁺ identifiziert. Das metabolomische Profil zeigte synergistische Effekte von BAP in Kombination von Cd²⁺. Als Schlüsselsignalweg wurde eine durch PC-PLC Aktivierung verstärkte Aktivierung des EGFRs HER2 identifiziert, welcher mit

proliferativen und karzinogenen Eigenschaften der Testsubstanzen in Verbindung gebracht wurde. Durch gezielte Inhibition von Schritten im identifizierten Signalweg wurde ein mechanistischer „Kaskaden-Biomarker-Ansatz“ erarbeitet. Dieser wurde als *in vitro* Testsystem für Ko-Expositionen von PAKs, wie BAP, mit Schwermetallen, wie Cd^{2+} , postuliert. Die Anwendbarkeit dieses Ansatzes für die Erfassung additiver und synergistischer Effekte wurde gezeigt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen das hohe Potenzial von *Metabolomics* Methoden für den Einsatz in der Risikobewertung. Es wurden neue metabolomische Biomarker identifiziert. Außerdem wurden über ergänzende zelluläre Methoden, sowie Anwendung spezifischer Inhibitoren, Einblicke in toxische Signalwege gewonnen. Darüber hinaus wird ein neuartiger Ansatz für ein *in vitro* Testsystem für Mischexpositionen präsentiert.

7. Summary

In the presented work, metabolomics was combined with cellular assays, in order to promote the development of new, mechanism based, *in vitro* test systems for risk assessment of consumer related chemicals, especially of substance mixtures.

In the first part, effects on the metabolome of HaCaT cells triggered by the three different PAHs: CRY, BAP and DALP were investigated for the first time. The studied PAHs possess different carcinogenic potencies and affinities to bind the AHR. Differences in CYP-expression and viability of exposed cells showed the distinct effects of the studied PAHs depending on AHR activation. A targeted metabolomics approach revealed 24 metabolomic biomarkers which further pointed out the differential effects of the investigated PAHs. Metabolite level changes indicated influences on energy and lipid metabolism.

In the second part, effects of E2, BPA and Cd²⁺ on the metabolome of MCF-7 cells were investigated. For the first time, a set of eleven estrogenic biomarkers was identified that were regulated similarly upon E2 and BPA exposure. Co-exposure experiments of E2 or BPA, with or without the heavy metal Cd²⁺, showed a slight modulation of the estrogenic metabolite pattern. Cellular assays, *e.g.* expression studies of ER target genes, revealed no effects of Cd²⁺ in co-exposure experiments. The amino acid Pro was identified as most prominent estrogenic biomarker. Pro increase could be correlated with proliferation in the studied MCF-7 cells. Mechanistic investigations confirmed ER α dependency. Further, the underlying signaling was found to involve the oncoprotein MYC.

In the third part, 18 lipid biomarkers were identified in MCF-7 cells for co-exposure of BAP and Cd²⁺. The metabolomic pattern showed synergistic effects of BAP in combination with Cd²⁺. An increased activation of EGFR HER2 caused by enhanced activation of PC-PLC activation was identified as key signaling pathway. Activation of this mechanism was associated with proliferative and carcinogenic potencies of the test chemicals. Based on specific inhibition of steps in the identified pathway and

examination of the resulting metabolomic pattern changes, a mechanistic “cascade biomarker approach” was established. This was postulated as *in vitro* test system for co-exposure scenarios of PAHs, like BAP, with heavy metals, like Cd²⁺. The approach is further suitable for the detection of additive and synergistic effects. This work shows the high potential of metabolomics approaches for the application in toxicological risk assessment. New metabolomic biomarkers were identified. Further, insights into the underlying toxic signaling pathways were gained through application of cellular assays and specific inhibitors. Moreover, a new approach for an *in vitro* test system for mixture toxicology is presented.

8. Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
AEP	Adverse Exposure Pathway
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AHR-KD	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor defiziente HaCaT Zellen
Akt	Protein Kinase B
AOP	Adverse Outcome Pathway
AP-1	Aktivator-Protein-1
ARNT	Nuklearer Translokator des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors
BAP	Benzo[<i>a</i>]pyren
BPA	Bisphenol A
<i>CCND1</i>	Cyclin D1 (Gen)
c-Fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
COT	Serin-Threonin-Kinase COT
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase-1
CRY	Chrysen
CYP	Cytochrom-P450
D609	<i>O</i> -Tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}]dec-9-yl dithiocarbonate potassium salt
DALP	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyren
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 β -Estradiol

Abkürzungen

EDC	Endocrine Disruptive Chemical
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogen Rezeptor
ERE	Estrogen Responsives Element
FIA	Fließinjektionsanalyse
Gln	Glutamin
GLS	Glutaminase
Glu	Glutamat
GS	Glutamin Synthetase
GSA	Glutamatsemialdehyd
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
HO-1	Hämoxigenase-1
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
His	Histidin
HSP90	Heat Shock Protein 90
<i>HSPB8</i>	Heat Shock Protein family (small) member 8 (gene)
IARC	International Agency for Research on Cancer
α KG	<i>alpha</i> -Ketoglutarat
LC	Flüssigchromatographie
Leu	Leucin
MANOVA	Multivariate Analysis of Variance
MAP	Mitogen activated protein
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7

Abkürzungen

MKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
NF κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
p53	Transkriptionsfaktor p53
P5C	Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat
P5CDH	P5C-Dehydrogenase
P5CS	Δ 1-Pyrrolin-5-carboxylat-Synthase
PCaa	Phosphatidylcholin, acyl-acyl
Cxx:y	CH ₂ -Gruppen in Fettsäureketten (xx) und Doppelbindungen (y)
PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
<i>PGR</i>	Progesteron Rezeptor (Gen)
POX/PRODH	Prolin-Dehydrogenase
Pro	Prolin
PVC	Polyvinylchlorid
PYCR1	P5C-Reduktase 1
RelA	Rel-Protein A
Ro-318220	2-{1-[3-(Amidinothio)propyl]-1H-indol-3-yl}-3-(1-methylindol-3-yl)maleimide methanesulfonate salt
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
siRNA	Small interfering ribonucleic acid

Abkürzungen

TCDD	2,3,7,8-Tetracholorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
<i>TFF1</i>	Trefoil Factor 1 (Gen)
WHO	Word Health Organization
WT	Wildtyp
XRE	Xenobiotic Response Element

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zum Arbeitsablauf von Metabolomics Studien.....	3
Abbildung 2: Kanonischer AHR Signalweg.....	8
Abbildung 3: Mechanismus der Aktivierung nukleärer Estrogenrezeptoren.....	11
Abbildung 4: Pro Biosynthese und Degradierung.....	95

10. Literaturverzeichnis

- Ahmed, S., Wang, A., Celius, T., Matthews, J., 2014. Zinc finger nuclease-mediated knockout of *AHR* or *ARNT* in human breast cancer cells abolishes basal and ligand-dependent regulation of *CYP1B1* and differentially affects estrogen receptor α transactivation. *Toxicol. Sci.* 138, 89–103. doi:10.1093/toxsci/kft274
- Ali, D., Verma, A., Mujtaba, F., Dwivedi, A., Hans, R.K., Ray, R.S., 2011. UVB-induced apoptosis and DNA damaging potential of chrysene via reactive oxygen species in human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 204, 199–207. doi:10.1016/j.toxlet.2011.04.033
- Ali, I., Damdimopoulou, P., Stenius, U., Halldin, K., 2015. Cadmium at nanomolar concentrations activates Raf–MEK–ERK1/2 MAPKs signaling via EGFR in human cancer cell lines. *Chem. Biol. Interact.* 231, 44–52. doi:10.1016/j.cbi.2015.02.014
- Allison, A.C., Mallucci, L., 1964. Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes. *Nature* 203, 1024–1027.
- Alvarez, S.M., Gómez, N.N., Scardapane, L., Fornés, M.W., Giménez, M.S., 2007. Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology. *BioMetals* 20, 727–741. doi:10.1007/s10534-006-9036-9
- Ami, D., Natalello, A., Mereghetti, P., Neri, T., Zanoni, M., Monti, M., Doglia, S.M., Redi, C.A., 2010. FT-IR spectroscopy supported by PCA – LDA analysis for the study of embryonic stem cell differentiation. *Spectroscopy* 24, 89–97. doi:10.3233/SPE-2010-0411
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741. doi:10.1002/etc.34
- Bartsch, N., Heidler, J., Vieth, B., Hutzler, C., Luch, A., 2016. Skin permeation of polycyclic aromatic hydrocarbons: a solvent-based in vitro approach to assess dermal exposures against benzo[*a*]pyrene and dibenzopyrenes. *J. Occup. Environ. Hyg.* 13, 969–979. doi:10.1080/15459624.2016.1200724
- BfR, 2014. BfR-Empfehlung führt europaweit zur Beschränkung krebserzeugender PAK in Verbraucherprodukten. Pressemitteilung, 04/2014.
- BfR, 2010. Krebserzeugende polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Verbraucherprodukten sollen EU-weit reguliert werden - Risikobewertung des BfR im Rahmen eines Beschränkungs-vorschlages unter REACH. Stellungnahme, 32/2010.
- Billiard, S.M., Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Hodson, P. V, Di Giulio, R.T., 2008.

- Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol. Sci.* 105, 5–23. doi:10.1093/toxsci/kfm303
- Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P., 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8, 444–472. doi:10.1023/A:1018465507029
- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H.T., Kleensang, A., Zhao, L., 2013. Review: toxicometabolomics. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1365–1383. doi:10.1002/jat.2874
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771. doi:10.1083/jcb.106.3.761
- Buters, J.T.M., Mahadevan, B., Quintanilla-Martinez, L., Gonzalez, F.J., Greim, H., Baird, W.M., Luch, A., 2002. Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[*a,h*]pyrene-induced tumor formation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1127–1135. doi:10.1021/tx020017q
- Carpenter, R.L., Jiang, B.H., 2013. Roles of EGFR, PI3K, AKT, and mTOR in heavy metal-induced cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 252–266. doi:10.2174/1568009611313030004
- Caruso, J.A., Mathieu, P.A., Joiakim, A., Leeson, B., Kessel, D., Sloane, B.F., Reiners, J.J., 2004. Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents. *Mol. Pharmacol.* 65, 1016–1028. doi:10.1124/mol.65.4.1016
- Carvalho, R.N., Lettieri, T., 2011. Proteomic analysis of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to benzo[*a*]pyrene. *BMC Genomics* 12, 159. doi:10.1186/1471-2164-12-159
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 1995. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 25, 677–688. doi:10.3109/00498259509061885
- Chai, Y.C., Binion, D.G., Chisolm, G.M., 2000. Relationship of molecular structure to the mechanism of lysophospholipid-induced smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H1830-8.
- Choe, S.Y., Kim, S.J., Kim, H.G., Lee, J.H., Choi, Y., Lee, H., Kim, Y., 2003. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci. Total Environ.* 312, 15–21. doi:10.1016/S0048-9697(03)00190-6
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384. doi:10.1289/ehp.93101378

- Commission-Directive, 2013. Commission Directive 2011/8/EU, amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. Off. J. Eur. Communities 11–14.
- Denier, X., Hill, E.M., Rotchell, J., Minier, C., 2009. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. *Toxicol. Vitro*. 23, 569–573. doi:10.1016/j.tiv.2009.01.006
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Deroo, B.J., Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 116, 561–570. doi:10.1172/JCI27987
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51–78. doi:10.1002/mas
- Dubik, D., Shiu, R.P., 1988. Transcriptional regulation of *c-myc* oncogene expression by estrogen in hormone-responsive human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 263, 12705–12708.
- EFSA, 2015. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA J.* 13, 3978. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978
- Elbekai, R.H., El-Kadi, A.O.S., 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202, 249–269. doi:10.1016/j.tox.2004.05.009
- Fernandez-Leborans, G., Gabilondo, R., Ruiz-Álvarez, S., 2007. Inter-annual depth-dependent toxicity and bioaccumulation of cadmium in marine benthic protist communities. *Oceanologia* 49, 305–336.
- Fletcher, N., Wahlström, D., Lundberg, R., Nilsson, C.B., Nilsson, K.C., Stockling, K., Hellmold, H., Håkansson, H., 2005. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 1–24. doi:10.1016/j.taap.2004.12.003
- Forbes, N.S., Meadows, A.L., Clark, D.S., Blanch, H.W., 2006. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 8, 639–652. doi:10.1016/j.ymben.2006.06.005
- Forgacs, A.L., Kent, M.N., Makley, M.K., Mets, B., DelRaso, N., Jahns, G.L., Burgoon, L.D., Zacharewski, T.R., Reo, N. V., 2012. Comparative metabolomic and genomic analyses of TCDD-elicited metabolic disruption in mouse and rat liver. *Toxicol. Sci.* 125, 41–55. doi:10.1093/toxsci/kfr262

- Fritsche, E., Schäfer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hübenthal, U., Cline, J.E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L.-O., Rannug, A., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J., Krutmann, J., 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8851–6. doi:10.1073/pnas.0701764104
- Frueh, F.W., Hayashibara, K.C., Brown, P.O., Whitlock, J.P., 2001. Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol. Lett.* 122, 189–203. doi:10.1016/S0378-4274(01)00364-2
- Gao, Y., Zhang, Y., Gao, J., Zhang, H., Zheng, L., Chen, J., 2012. Determination of bisphenol A from toys and food contact materials by derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Chinese J. Chromatogr.* 30, 1017–1020. doi:10.3724/SP.J.1123.2012.08015
- García-Cañaveras, J.C., Donato, M.T., Castell, J. V, Lahoz, A., 2011. A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J. Proteome Res.* 10, 4825–4834. doi:10.1021/pr200629p
- Garcia-Morales, P., Saceda, M., Kenney, N., Kim, N., Salomon, D.S., Gottardis, M.M., Solomon, H.B., Sholler, P.F., Jordan, V.C., Martin, M.B., 1994. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 269, 16896–16901. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.08.027
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2011. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol.* 688, 1–23.
- Gelbke, H.P., Kayser, M., Poole, A., 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205, 17–25. doi:10.1016/j.tox.2004.06.034
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G., Kell, D.B., 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 22, 245–252. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.007
- Gurbani, D., Bharti, S.K., Kumar, A., Pandey, A.K., Ana, G.R.E.E., Verma, A., Khan, A.H., Patel, D.K., Mudiam, M.K.R., Jain, S.K., Roy, R., Dhawan, A., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 553–565. doi:10.1016/j.ijheh.2013.04.001
- Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., Coumoul, X., 2013. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov. Today* 18, 479–486. doi:10.1016/j.drudis.2012.11.014
- Hall, M., Grover, P.L., 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Metabolism,

- Activation and Tumour Initiation, in: Cooper, C.S., Grover, P.L. (Eds.), Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin, pp. 327–372. doi:10.1007/978-3-642-74775-5_9
- Hartman, Z., Zhao, H., Agazie, Y.M., 2013. HER2 stabilizes EGFR and itself by altering autophosphorylation patterns in a manner that overcomes regulatory mechanisms and promotes proliferative and transformation signaling. *Oncogene* 32, 4169–4180. doi:10.1007/s40778-014-0003-z.Genome
- Hartung, T., van Vliet, E., Jaworska, J., Bonilla, L., Skinner, N., Thomas, R., 2012. Systems toxicology. *ALTEX* 29, 119–128. doi:10.14573/altex.2012.2.119
- Hengstler, J.G., Foth, H., Gebel, T., Kramer, P.-J., Lilienblum, W., Schweinfurth, H., Völkel, W., Wollin, K.-M., Gundert-Remy, U., 2011. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 263–291. doi:10.3109/10408444.2011.558487
- IARC, 2014. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 105, 1–714.
- IARC, 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 92, 1–853.
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A.L., Kafri, R., Kirschner, M.W., Clish, C.B., Mootha, V.K., 2012. Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. *Science*. 336, 1040–1045.
- Jarvis, I.W.H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., Stenius, U., 2014. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology* 321, 27–39. doi:10.1016/j.tox.2014.03.012
- Johnson, C.H., Ivanisevic, J., Siuzdak, G., 2016. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 451–9. doi:10.1038/nrm.2016.25
- Johnson, M.D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Sholler, P.F., Lirio, A.A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S., Martin, M.B., 2003. Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* 9, 1081–1084. doi:10.1038/nm902
- Jungnickel, H., Potratz, S., Baumann, S., Tarnow, P., von Bergen, M., Luch, A., 2014. Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[*a*]pyrene and cadmium: the toxicological cascade biomarker approach. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10423–10431. doi:10.1021/es502419w
- Kalkhof, S., Dautel, F., Loguercio, S., Baumann, S., Trump, S., Jungnickel, H., Otto, W., Rudzok, S., Potratz, S., Luch, A., Lehmann, I., Beyer, A., von Bergen, M., 2015. Pathway and time-resolved benzo[*a*]pyrene toxicity on Hepa1c1c7 cells

- at toxic and subtoxic exposure. *J. Proteome Res.* 14, 164–182. doi:10.1021/pr500957t
- Lee, J.H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M.J., Gonzalez, F.J., Xie, W., 2010. A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* 139, 653–663. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.033
- Lewtas, J., 2007. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res.* 636, 95–133. doi:10.1016/j.mrrev.2007.08.003
- Li, Y., Luh, C.J., Burns, K.A., Arao, Y., Jiang, Z., Teng, C.T., Tice, R.R., Korach, K.S., 2013. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs): *in vitro* mechanism of estrogenic activation and differential effects on ER target genes. *Environ. Health Perspect.* 121, 459–466. doi:10.1289/ehp.1205951
- Liang, K., Lu, Y., Jin, W., Ang, K.K., Milas, L., Fan, Z., 2003. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1113–1120.
- Lijinsky, W., 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat. Res.* 259, 251–261. doi:10.1016/0165-1218(91)90121-2
- Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C. V., Fan, T.W.-M., Phang, J.M., 2012. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8983–8988. doi:10.1073/pnas.1203244109
- Luberto, C., Hannun, Y.A., 1998. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. *J. Biol. Chem.* 273, 14550–14559.
- Luch, A., Baird, W.M., 2010. Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, Inc, Amsterdam, pp. 85–123.
- Luch, A., Coffing, S.L., Tang, Y.M., Schneider, A., Soballa, V., Greim, H., Jefcoate, C.R., Seidel, A., Greenlee, W.F., Baird, W.M., Doehmer, J., 1998. Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[*a,h*]pyrene. *Chem Res Toxicol* 11, 686–695. doi:10.1021/tx970236p
- Maertens, A., Bouhifd, M., Zhao, L., Odwin-DaCosta, S., Kleensang, A., Yager, J.D., Hartung, T., 2016. Metabolomic network analysis of estrogen-stimulated MCF-7 cells: a comparison of overrepresentation analysis, quantitative enrichment analysis and pathway analysis versus metabolite network analysis. *Arch.*

- Toxicol. 91, 217–230. doi:10.1007/s00204-016-1695-x
- Marie, C., Maître, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A., Ravanat, J.-L., 2008. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[*a*]pyrene DNA adducts. *J. Appl. Toxicol.* 28, 579–590. doi:10.1002/jat.1306
- Marone, P.A., Hall, W.C., Hayes, A.W., 2014. Reassessing the two-year rodent carcinogenicity bioassay: a review of the applicability to human risk and current perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68, 108–118. doi:10.1016/j.yrtph.2013.11.011
- Mendum, T., Stoler, E., VanBenschoten, H., Warner, J.C., 2011. Concentration of bisphenol A in thermal paper. *Green Chem. Lett. Rev.* 4, 81–86. doi:10.1080/17518253.2010.502908
- Michaelson, J.J., Trump, S., Rudzok, S., Gräbsch, C., Madureira, D.J., Dautel, F., Mai, J., Attinger, S., Schirmer, K., von Bergen, M., Lehmann, I., Beyer, A., 2011. Transcriptional signatures of regulatory and toxic responses to benzo[*a*]pyrene exposure. *BMC Genomics* 12, 502. doi:10.1186/1471-2164-12-502
- Minnich, A., Tian, N., Byan, L., Bilder, G., 2001. A potent PPAR α agonist stimulates mitochondrial fatty acid β -oxidation in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E270–E279.
- Murray, I.A., Morales, J.L., Flaveny, C.A., DiNatale, B.C., Chiaro, C., Gowdahalli, K., Amin, S., Perdew, G.H., 2010. Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 77, 247–254. doi:10.1124/mol.109.061788.
- Murray, I.A., Patterson, A.D., Perdew, G.H., 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* 14, 801–814. doi:10.1038/nrc3846
- Nam, S.-Y., Youu, M.-S., Kim, H.-M., Jeong, H.-J., 2016. Efficacy of proline in the treatment of menopause. *Exp. Biol. Med.* 241, 611–619. doi:10.1177/1535370216629011
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85. doi:10.1016/S0006-2952(99)00310-X
- Nordqvist, M., Thakker, D.R., Vyas, K.P., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D.E., Thomas, P.E., Conney, A.H., Jerina, D.M., 1981. Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.* 19, 168–178.
- OECD, 2013. Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France. 1–45. ENV/JM/HA/RD1

- OECD/IPCS, 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/ED, 02.2.
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2009. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem. Pharmacol.* 77, 474–484. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.034
- Paris, L., Cecchetti, S., Spadaro, F., Abalsamo, L., Lugini, L., Pisanu, M.E., Iorio, E., Natali, P.G., Ramoni, C., Podo, F., 2010. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells. *Breast cancer Res.* 12, R27. doi:10.1186/bcr2575
- Paschke, M., Hutzler, C., Brinkmann, J., Henkler, F., Luch, A., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in newspaper inks: migration, metabolism, and genotoxicity in human skin. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 32–40. doi:10.1080/10406638.2014.900643
- Penning, T.M., Ohnishi, S.T., Ohnishi, T., Harvey, R.G., 1996. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 84–92. doi:10.1021/tx950055s
- Phang, J.M., Liu, W., Hancock, C., Christian, K.J., 2012. The proline regulatory axis and cancer. *Front. Oncol.* 2, eCollection2012. doi:10.3389/fonc.2012.00060
- Phang, J.M., Liu, W., Hancock, C.N., Fischer, J.W., 2015. Proline metabolism and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 18, 71–77. doi:10.1097/MCO.000000000000121
- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., Chen, W.W., Barrett, F.G., Stransky, N., Tsun, Z.-Y., Cowley, G.S., Barretina, J., Kalaany, N.Y., Hsu, P.P., Ottina, K., Chan, A.M., Yuan, B., Garraway, L.A., Root, D.E., Mino-Kenudson, M., Brachtel, E.F., Driggers, E.M., Sabatini, D.M., 2011. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350. doi:10.1038/nature10350
- Puga, A., Maier, A., Medvedovic, M., 2000. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1129–1142.
- Ralston, S.L., Lau, H.H.S., Seidel, A., Luch, A., Platt, K.L., Baird, W.M., 1994. The potent carcinogen dibenzo[*a,h*]pyrene is metabolically activated to fjord-region 11,12-diol 13,14-epoxides in human mammary carcinoma MCF-7 cell cultures. *Cancer Res.* 54, 887–890.
- Ruiz-Aracama, A., Peijnenburg, A., Kleinjans, J., Jennen, D., van Delft, J., Hellfrisch, C., Lommen, A., 2011. An untargeted multi-technique metabolomics approach

- to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *BMC Genomics* 12, 251. doi:10.1186/1471-2164-12-251
- Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W.-H., Roots, I., 2001. Differential metabolism of benzo[*a*]pyrene and benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* 22, 453–459. doi:10.1093/carcin/22.3.453
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276. doi:10.2133/dmpk.21.257
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x
- Siddens, L.K., Larkin, A., Krueger, S.K., Bradfield, C.A., Waters, K.M., Tilton, S.C., Pereira, C.B., Löhr, C. V, Arlt, V.M., Phillips, D.H., Williams, D.E., Baird, W.M., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[*a*]pyrene, dibenzo[*def,p*]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 377–86. doi:10.1016/j.taap.2012.08.014
- Siewit, C.L., Gengler, B., Vegas, E., Puckett, R., Louie, M.C., 2010. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. *Mol. Endocrinol.* 24, 981–992. doi:10.1210/me.2009-0410
- Silva, E., Lopez-Espinosa, M.J., Molina-Molina, J.M., Fernández, M., Olea, N., Kortenkamp, A., 2006. Lack of activity of cadmium in *in vitro* estrogenicity assays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 20–28. doi:10.1016/j.taap.2006.04.002
- Silva, N., Peiris-John, R., Wickremasinghe, R., Senanayake, H., Sathiakumar, N., 2012. Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *J. Appl. Toxicol.* 32, 318–332. doi:10.1002/jat.1771
- Solecki, R., Kortenkamp, A., Bergman, Å., Chahoud, I., Degen, G., Dietrich, D., Greim, H., Håkansson, H., Hass, U., Husoy, T., Jacobs, M., Jobling, S., Mantovani, A., Marx-Stoelting, P., Piersma, A., Slama, R., Stahlmann, R., van den Berg, M., Zoeller, R.T., Boobis, A., 2016. Scientific principles for the identification of endocrine disrupting chemicals – a consensus statement. *Arch. Toxicol.* doi:10.1007/s00204-016-1866-9
- Soto, A.M., Maffini, M. V., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C., 2006. Strengths and weaknesses of *in vitro* assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 15–33. doi:10.1016/j.beem.2005.09.001
- Stolpmann, K., Brinkmann, J., Salzmann, S., Genkinger, D., Fritsche, E., Hutzler, C., Wajant, H., Luch, A., Henkler, F., 2012. Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced

- apoptosis. *Cell Death Dis.* 3, e388. doi:10.1038/cddis.2012.127
- Teeguarden, J.G., Tan, Y.M., Edwards, S.W., Leonard, J.A., Anderson, K.A., Corley, R.A., Kile, M.L., Simonich, S.M., Stone, D., Tanguay, R.L., Waters, K.M., Harper, S.L., Williams, D.E., 2016. Completing the link between exposure science and toxicology for improved environmental health decision making: the aggregate exposure pathway framework. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4579–4586. doi:10.1021/acs.est.5b05311
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[*a*]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 68–76. doi:10.1016/j.taap.2009.11.014
- Tilton, S.C., Siddens, L.K., Krueger, S.K., Larkin, A.J., Löhr, C. V, Williams, D.E., Baird, W.M., Waters, K.M., 2015. Mechanism-based classification of PAH mixtures to predict carcinogenic potential. *Toxicol. Sci.* 146, 135–145. doi:10.1093/toxsci/kfv080
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krčmár, P., Pencíková, K., Machala, M., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial “stem-like” cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 638, 122–132. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.09.004
- Tralau, T., Oelgeschläger, M., Gürtler, R., Heinemeyer, G., Herzler, M., Höfer, T., Itter, H., Kuhl, T., Lange, N., Lorenz, N., Müller-Graf, C., Pabel, U., Pirow, R., Ritz, V., Schafft, H., Schneider, H., Schulz, T., Schumacher, D., Zellmer, S., Fleur-Böl, G., Greiner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Lampen, A., Luch, A., Schönfelder, G., Solecki, R., Wittkowski, R., Hensel, A., 2015. Regulatory toxicology in the twenty-first century: challenges, perspectives and possible solutions. *Arch. Toxicol.* 89, 823–850. doi:10.1007/s00204-015-1510-0
- US EPA, 2010. Development of a relative potency factor (RPF) approach for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. U.S. Environ. Prot. Agency Washington, EPA/635/R-08/012A.
- Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q., Kaminsky, L.S., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HepG2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 29, 999–1006.
- van Ravenzwaay, B., Herold, M., Kamp, H., Kapp, M.D., Fabian, E., Looser, R., Krennrich, G., Mellert, W., Prokoudine, A., Strauss, V., Walk, T., Wiemer, J., 2012. Metabolomics: a tool for early detection of toxicological effects and an opportunity for biology based grouping of chemicals-from QSAR to QBAR. *Mutat. Res.* 746, 144–150. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.006
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: cell proliferation. *Science* (80-.). 324, 1029–1033.

- Verordnung 1272/2013 (EU), 2013. Verordnung der Europäischen Union (EU) Nr. 1272/2013 der Kommission vom 6. Dezember 2013 zur Änderung von Anhang XVII der Verordnung der Europäischen Gemeinschaft (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlament und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) hinsichtlich polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. 328/69-71.
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M., Pedraza, V., 1995. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103, 844–850. doi:10.1289/ehp.95103844
- Wang-Sattler, R., Yu, Y., Mittelstrass, K., Lattka, E., Altmaier, E., Gieger, C., Ladwig, K.H., Dahmen, N., Weinberger, K.M., Hao, P., Liu, L., Li, Y., Wichmann, H.E., Adamski, J., Suhre, K., Illig, T., 2008. Metabolic profiling reveals distinct variations linked to nicotine consumption in humans - first results from the KORA study. *PLoS One* 3, e3863. doi:10.1371/journal.pone.0003863
- Wang, C., Mayer, J.A., Mazumdar, A., Fertuck, K., Kim, H., Brown, M., Brown, P.H., 2011. Estrogen induces *c-myc* gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Mol. Endocrinol.* 25, 1527–1538. doi:10.1210/me.2011-1037
- Westman, O., Nordén, M., Larsson, M., Johansson, J., Venizelos, N., Hollert, H., Engwall, M., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) reduce hepatic β -oxidation of fatty acids in chick embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 1881–1888. doi:10.1007/s11356-012-1418-7
- Wink, S., Hiemstra, S., Huppelschoten, S., Danen, E., Hendriks, G., Vrieling, H., Herpers, B., van de Water, B., 2014. Quantitative high content imaging of cellular adaptive stress response pathways in toxicity for chemical safety assessment quantitative high content imaging of cellular adaptive stress response pathways. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 338–355. doi:10.1021/tx4004038
- Wymann, M.P., Schneider, R., 2008. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 162–176. doi:10.1038/nrm2335
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93. doi:10.1016/j.taap.2004.11.006
- Yoon, J.-H., Besaratinia, A., Feng, Z., Tang, M., Amin, S., Luch, A., Pfeifer, G.P., 2004. DNA damage, repair, and mutation induction by (+)-*syn*- and (–)-*anti*-dibenzo[*a,h*]pyrene-11,12-diol-13,14-epoxides in mouse cells. *Cancer Res.* 64, 7321–7328. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1094

11. Publikationsliste

11.1. Publikationen in Peer-Review Fachzeitschriften

- (1) Potratz, S., Jungnickel, H., Grabiger, S., Tarnow, P., Otto, W., Fritsche, E., von Bergen, M. und Luch, A., 2016. Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,h*]pyrene. *Tox. Rep.* 3, 763-773. doi: 10.1016/j.toxrep.2016.09.003
- (2) Potratz, S., Tarnow, P., Jungnickel, H., Baumann, S., von Bergen, M., Tralau, T., und Luch, A., 2016. Combination of metabolomics with cellular assays reveals new biomarkers and mechanistic insights on xenoestrogenic exposures in MCF-7 cells. *Chem. Res. in Toxicol., Systems Toxicology II.* doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00106
- (3) Jungnickel, H., Potratz, S., Baumann, S., Tarnow, P., von Bergen, M., Luch, A., 2014. Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[*a*]pyrene and cadmium: the toxicological cascade biomarker approach. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10423–10431. doi:10.1021/es502419w
- (4) Kalkhof, S., Dautel, F., Loguercio, S., Baumann, S., Trump, S., Jungnickel, H., Otto, W., Rudzok, S., Potratz, S., Luch, A., Lehmann, I., Beyer, A., von Bergen, M., 2014. Pathway and time-resolved benzo[*a*]pyrene toxicity on Hepa1c1c7 cells at toxic and subtoxic exposure. *J. Proteome Res.* 14, 164–182. doi:10.1021/pr500957t
- (5) Baumann, S., Rockstroh, M., Barthel, J., Krumsiek, J., Otto, W., Jungnickel, H., Potratz, S., Luch, A., Willscher, E., Theis, F. J., von Bergen, M., Tomm, J. M., 2014. Subtoxic concentrations of benzo[*a*]pyrene induce metabolic changes and oxidative stress in non-activated and affect the mTOR pathway in activated Jurkat T cells. *J. Integr. OMICS* 4, 11-20. doi:10.5584/jiomics.v4i1.157

(6) Imhasly, S., Naegeli, H., Baumann, S., von Bergen, M., Luch, A., Jungnickel, H., Potratz, S., Gerspach, C., 2014. Metabolomic biomarkers correlating with hepatic lipidosis in dairy cows. BMC Vet. Res. 10, 122. doi: 10.1186/1746-6148-10-122

11.2. Konferenzbeiträge

Potratz, S., Tarnow, P., Jungnickel, H., Baumann, S., von Bergen, M., Tralau, T. and Luch, A., 2016. A targeted metabolomics approach reveals proline as a biomarker candidate for (xeno)estrogenic effects in MCF-7 cells. Präsentiert auf dem German Pharmtox Summit der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Berlin, Deutschland

Potratz, S., Jungnickel, H., Baumann, S., Tarnow, P., von Bergen, M., Luch A., 2013. Identification of metabolomic biomarkers indicative for co-exposure of human cells to PAHs and heavy metals. Präsentiert auf der Metabolomics Society Conference, Glasgow, UK

Potratz, S., Krüger, A., Zellmer, S., Jungnickel, H., Hengstler, J., Luch, A., 2013. Drug-induced alterations in the metabolome of primary hepatocytes. Zeitschrift für Gastroenterologie, Präsentiert auf der Konferenz der German Association for the Study of the Liver (GASL), Hannover, Germany

Jungnickel, H., Potratz, S., Tarnow, Baumann, S., Henkler, F., von Bergen, M. and Luch, A., 2012. Co-exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals: Identification of biomarkers from the metabolome of HaCaT cells treated with benzo[*a*]pyrene and nickel. Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis, Präsentiert auf der 3. International Conference of Biomarkers and Clinical Research, Las Vegas, USA