

Deutsche Bundesstiftung Umwelt
Referat Umweltchemie
Postfach 17 05

49007 Osnabrück



**Entwicklung von Ionischen Flüssigkeiten höherer
Eigensicherheit unter Verwendung einer flexiblen
(öko-)toxikologischen Testbatterie
„EIFL“**

AZ: 25448-31

Abschlussbericht

Projektlaufzeit: 01.07.2008 bis 31.12.2010

Verfasser:

Dr.rer.nat Karsten Gall
Ionovation GmbH, Osnabrück.

Dr.rer.nat Reinhold Störmann
CHEOPS Dienstleistungs-GmbH, Bremen.

Prof. Dr.-Ing. Jorg Thöming
Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien (UFT)
Universität Bremen, Bremen.

Bremen, März 2011

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	25448	Referat	31	Fördersumme	338.810,00 €
Antragstitel	Entwicklung von Ionischen Flüssigkeiten höherer Eigensicherheit unter Verwendung einer flexiblen (öko-)toxikologischen Testbatterie				
Stichworte	Analytik, Ökobilanz Chemikalie, Mikrobiologie, Ökotoxikologie				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
2 Jahre	01.07.2008	31.12.2010	2		
Zwischenberichte	Februar 2009	Dezember 2009			
Bewilligungsempfänger	Universität Bremen UFT Zentrum für Umweltforschung u. nachhaltige Technologien Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung Leobener Str. UFT 28359 Bremen			Tel 04 21/2 18-6 33 00 Fax 04 21/2 18-82 97 Projektleitung Prof. Dr.-Ing. Jorg Thöming Bearbeiter Dr. Jürgen Arning, Dr. Stefan Stolte	
Kooperationspartner	Inovation GmbH, 49084 Osnabrück Merck KGaA, 64293 Darmstadt CHEOPS GmbH, 28217 Bremen				

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Ein zentrales Element der Forderung nach einer nachhaltigen Chemie ist die Entwicklung von Chemikalien mit hoher Eigensicherheit, d.h. Substanzen, in denen schon bei der Synthesepaltung bewusst auf toxikologisch und ökotoxikologisch problematische Strukturelemente verzichtet wird. Ionische Flüssigkeiten stellen in diesem Zusammenhang eine Substanzklasse mit einem vielversprechenden Potenzial für die unterschiedlichsten technologischen Anwendungen dar. Aufgrund der Strukturvielfalt innerhalb dieser Substanzklasse lassen sich gezielt Verbindungen für eine technologische Anwendung „designen“. Diesem technologischen Vorteil steht jedoch diametral die Problematik der toxikologischen und ökotoxikologischen Bewertung einer solch unüberschaubar großen und dazu noch sehr heterogenen Substanzklasse gegenüber, die nur überwunden werden kann, wenn parallel zu der Optimierung der technologischen Eigenschaften vor allem auch eine Optimierung hin zu einem geringen Gefahrenpotenzial einer Ionischen Flüssigkeit stattfindet.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Für die Zukunft wird eine noch viel breitere Verwendung Ionischer Flüssigkeiten in unterschiedlichsten Verbraucherprodukten erwartet, so dass die bereits heute bestehende Exposition von Mensch und Umwelt gegenüber diesen Substanzen deutlich ansteigen kann. Gemessen daran ist das vorhandene Wissen zur Toxikologie und Ökotoxikologie von Ionischen Flüssigkeiten sehr begrenzt. Das Hauptziel dieses Projektes ist es daher, in einer Pilotstudie aufzuzeigen, wie man in enger Kooperation mit Industriepartnern mit Hilfe einer systematischen und integrierten Teststrategie - also einer wie unter der neuen EU Chemikalienverordnung geforderten anwendungsorientierten Teststrategie – und einer flexiblen toxikologischen/ökotoxikologischen Testbatterie zu einem nachhaltigen Design von Ionischen Flüssigkeiten mit einem reduzierten Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt kommen kann. Am Ende des Projektes soll dann ein Geschäftsmodell stehen, das die Testbatterie und das zu entwickelnde

internetbasierte Software-Tool Entwicklern und Anwendern von Ionischen Flüssigkeiten angeboten werden soll, um von Beginn an gezielt Strukturelemente mit einem geringen Gefahrenpotenzial für ihre Prozesse oder Produkte auszuwählen.

Folgende Projektziele sollen dazu in einem Zeitraum von 24 Monaten umgesetzt werden:

Anwendungsorientierte Erweiterung der bereits am UFT bestehenden Testbatterie um: a.) wirkmechanismenbasierte Testsysteme und b.) weitere Screening-Tests zur Erfassung von toxikologisch besonders relevanten Endpunkten.

Optimierung bestehender Testsysteme, um zukünftig das Screening großer Substanzdatenbanken (hinsichtlich der REACH-Fragestellungen) zu ermöglichen.

Testung von ausgewählten, durch die Kooperationspartner aus der Industrie (Merck, IoLiTec und Merck Solvent Innovation) vorgeschlagenen und entwickelten Ionischen Flüssigkeiten in der erweiterten und optimierten Testbatterie.

Parallele Optimierung bestehender und Etablierung neuer theoretischer Vorhersagemodelle (SAR- und QSAR-Modelle) für die jeweiligen Testsysteme zur prospektiven Abschätzung von Gefahrenpotenzialen von Ionischen Flüssigkeiten und für ionische Verbindungen generell auf Basis der generierten Daten.

Entwicklung eines internetbasierten Software-Tools für die Produzenten Ionischer Flüssigkeiten, mit der die Toxizitäten neuer Verbindungen für die einzelnen Testsysteme der Testbatterie über QSAR-Algorithmen abgeschätzt werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

Die drei wichtigsten Ziele dieses Projektes waren zum einen die Optimierung bestehender Testsysteme einer flexiblen Testbatterie hin zu miniaturisierten in vitro Screening-Systemen, mit denen sich bei minimiertem Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand große Mengen an Ionischen Flüssigkeiten und prinzipiell beliebig weiterer Chemikalien testen lassen. Zum zweiten sollte im Rahmen dieses Projektes die Testbatterie, in Zusammenarbeit mit der Ionovation GmbH, um neue Testsysteme erweitert werden. Dabei stand hier vor allem die detaillierte Aufklärung möglicher Wirkmechanismen von ILs im Vordergrund. Aufbauend auf vorhandenen toxikologischen Daten und der daraus folgenden Interpretation, dass viele ILs primär mit biologischen Membranen interagieren, sollte hier vor allem die Wechselwirkung von ILs mit Lipid-Doppelschichten mit weiteren zellfreien Methoden untersucht werden. Zusätzlich sollten neue Testsysteme in die Testbatterie integriert werden, die ein Screening auf mögliche besonders besorgniserregende Eigenschaften wie östrogene Wirksamkeit, genotoxische Effekte und das chemosensitivierende Potenzial von ILs liefern können.

Das dritte Ziel dieses Projektes war die Zusammenstellung der verfügbaren Daten und die Implementierung von Vorhersagealgorithmen zur prospektiven Gefahrenpotenzialanalyse von verschiedenen Kombinationen aus Kationen und Anionen von ILs. Dazu sollte ein datenbankbasiertes Internet Software-Tool entwickelt werden, dass Produzenten und Anwendern von ILs zur Verfügung gestellt werden soll.

Es wurde zunächst die bestehende Analytik erfolgreich optimiert, so dass jetzt die Analytik von Kationen und Anionen von ILs in verschiedenen Matrices möglich ist. Besonders erweitert werden konnte die Analytik durch ionenchromatographische Methoden, die jetzt in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektoren auch einen zuverlässigen und sensitiven Nachweis von nicht-aromatischen Kationen und vor allem von allen gängigen Anionen von ILs ermöglicht. Ebenfalls erfolgreich optimiert werden konnten die aquatischen Testsysteme mit der limnischen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* und der Wasserlinse *Lemna minor*. Für den Test mit der Wasserlinse ist es gelungen die Volumina und Bedingungen so zu optimieren, dass der Test jetzt in 6-Loch-Zellkulturplatten im 10mL Maßstab durchgeführt werden kann. Dies erlaubt bei gleichzeitiger Erhöhung der getesteten Konzentrationsstufen pro Zeiteinheit einen höheren Durchsatz an Substanzen und Replikaten. Dies erhöht die Effizienz und die statistische Sicherheit des Testes. Für die Algen ist es gelungen, den Ansatz ebenfalls auf 6-Loch-Zellkulturplatten zu übertragen, zum anderen konnte in Kooperation mit der Universität Göteborg ein alternatives Testdesign etabliert werden, dass den gesamten Arbeits- und Zeitaufwand um ca. 50% reduziert. Beide neuen Testansätze mit den Algen erlauben daher ein effizienteres Screenen von Substanzen. Die Validität der neue etablierten Testprotokolle für die Tests mit der Wasserlinse und mit der Grünalge wurde sowohl mit literaturbekannten Referenzsubstanzen, als auch mit ILs, für die nach den alten Protokollen schon Daten erhoben wurden, verifiziert. Die Abweichungen für beide Testorganismen zu den alten Protokollen liegen hier unter 10%, was für biologische Testsysteme ein ausgezeichnete Wert ist.

Bei den neu hinzugekommenen Testsystemen haben sich vor allem die elektrophysiologischen und fluoreszenzbasierten Untersuchungen der Ionovation GmbH als sehr erfolgreich dargestellt. Mit diesen Methoden konnten erstmals verschiedene Mechanismen der Interaktion von IL Kationen und Anionen mit biologischen Membranen sichtbar gemacht werden und es konnten für die unterschiedlichen Interaktionen so spezifische Struktur-Wirkungsbeziehungen für ILs abgeleitet werden. Des weiteren konnten mit dem E-Screen Assay, dem Umu-Test und dem Test auf chemosensitivierende Wirkung von ILs drei wichtige in vitro Testsysteme erfolgreich in die Testbatterie integriert werden, die es erlauben über die rein membranvermittelte Wirkung von ILs hinaus, weitere spezifische Endpunkte zu screenen. Besonders die Endpunkte zur östrogenen Wirksamkeit und zur Genotoxizität haben dabei hohe Aktualität für die Chemikaliengesetzgebung unter REACH. Die ersten Testkits, die mit diesen neuen Testsystemen untersucht wurden deuten an, dass für die ILs im Allgemeinen großer Forschungsbedarf auf diesen Gebieten besteht. Zu den genannten Testsystemen konnten weiterhin der *Arthrobacter*-Test, der somit auch das Kompartiment Boden für das Screening von ILs zugänglich macht, und verschiedene Enzymhemmtests und subzelluläre Endpunkte (oxidativer Stress) als spezifische Targets in die Testbatterie integriert werden. Nicht erfolgreich integriert werden konnten dagegen die geplanten Pflanzenzellkulturen. Hier erwiesen sich die nötigen Kulturbedingungen und das Handling als zu komplex, um ein robustes Screening-Testprotokoll zu entwickeln. Gedacht waren diese Pflanzenzellkulturen als Testsysteme zur Priorisierung von ILs für aufwändigere Pflanzenwachstumstests an z.B. Kresse oder Weizen. Alternativ wurde nun ein Test an dem Wasserfloh *Daphnia magna* mit aufgenommen, da dieser Test unmittelbar für REACH relevant ist.

Um das hier generierte Wissen zu ILS höherer Eigensicherheit auch unmittelbar den Produzenten und Anwendern von ILS zur Verfügung stellen zu können, ist ein datenbankgestütztes Tool nötig. Dieses soll zum einen die generierten Datensätze nach dem Baukastenprinzip in einem einheitlichen Format speichern und anschließend über verschiedene Vorhersagealgorithmen toxikologisch relevante Eigenschaften von neuen Kombinationen von Kationen und Anionen abschätzbar machen. Dazu wurden, aufbauend auf der bereits existierenden IL-Datenbank am UFT, von der CHEOPS GmbH in diesem Projekt zunächst Eingabetools für eine SQL-Datenbank für die neu etablierten Testsysteme entwickelt. Diese konnten erfolgreich in die Datenbankstruktur integriert werden und erlauben nun auch für weitere Testsysteme die automatische Generierung von Dosis-Wirkungskurven und die Berechnung toxikologisch relevanter Daten wie EC50 Werte aus diesen Rohdaten. Da sich wie oben diskutiert die Hydrophobie der bisher getesteten ILS als ein wesentlicher Parameter bei der Beschreibung der beobachteten toxischen Effekte herausgestellt hat, wurde dann ein Vorhersage-Tool zur Abschätzung der akuten Zytotoxizität beliebiger Kationen-Anionen Kombinationen aus der Datenbank basierend auf Hydrophobieparametern entwickelt. Dieses Tool konnte von der Cheops GmbH erfolgreich in die Datenbank integriert werden. Es wird nach der wissenschaftlichen Publikation der zugrundeliegenden Daten für alle Nutzer öffentlich freigeschaltet. Besonders erwähnenswert ist hier noch die erfolgreiche Kooperation mit der Universität Freiburg und dem UFT, wo in einem anderen von der DBU geförderten Projekt diese Vorhersagemöglichkeiten gerade um quantenchemische Berechnungen erweitert werden. Die aktuellen Arbeiten zeigen dabei bereits eine sehr gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment, so dass es in naher Zukunft möglich sein wird, auch für noch völlig unbekannte IL Strukturen deren Gefahrenpotenzial vorherzusagen.

Um ein solches Tool in Kombination mit der Testbatterie in Zukunft auch als Dienstleistung für Chemikalienproduzenten anbieten zu können, haben sich die Koordinatoren des Projektes in dem Bremer Programm zur Förderung von Unternehmensgründungen durch Hochschulabsolventen/-innen, Young Professionals - „BRUT“ im Rahmen dieses Projektes weiterqualifiziert, um die Chancen und Risiken einer Unternehmensausgründung detailliert zu bewerten. So kann nun zu Projektende ein vollständig ausgearbeiteter Businessplan vorgelegt werden, der neben einer Kostenkalkulation auch eine umfangreiche Marktanalyse beinhaltet. Aufgrund dieser Marktanalyse wurde beschlossen, die Ausgründung vorerst zu verschieben, bis auf regulatorischer Ebene mehr Sicherheit für die Unternehmen über die Nutzbarkeit der durch die Testbatterie erhobenen Daten gewährleistet ist. Sollte dieses Investitionshemmnis abgebaut sein sehen die Projektpartner hier großes Potenzial für die Markteinführung der oben skizzierten Dienstleistung. Die Eckdaten und Überlegungen dafür liegen mit dem hier angehängten Businessplan dann bereits vor und können schnell umgesetzt werden.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Publikationen und Fachvorträge erarbeitet:

- Stolte, S. (2010) Fachvortrag: „Entwicklung von nachhaltigen Chemikalien - Testung und Bewertung der Umweltgefährlichkeit.“ AG Prof.Thomas Straßner TU Dresden. Organisch-Chemisches Kolloquium
- Stolte, S. (2009) Fachvortrag: “(Eco)toxicity and biodegradation of ionic liquids – progress in designing inherently safer chemicals.” BATIL-2 (Biodegradability and Toxicity of Ionic Liquids) Konferenz, Frankfurt
- Stolte,S., Steudte,S., Igartua,A., and Stepnowski,P. (2010) Biodegradation of ionic liquids - a view from a chemical structure perspective. *Current Organic Chemistry*, accepted for publication.
- Arning J., and Matzke M. (2010) Toxicity of ionic liquids towards mammalian cell lines. *Current Organic Chemistry*, Special Issue "Ionic liquids: analytical and environmental issues", review, accepted for publication.
- Chul-Woong Cho, Ulrich Preiss, Christian Jungnickel, Stefan Stolte, Jürgen Arning, Johannes Ranke , Andreas Klamt, Ingo Krossing, Jorg Thöming. Ionic Liquids: Predictions of physicochemical properties with experimental and/or DFT calculated LFER parameters to understand molecular interactions in solution. Accepted for publication in *The Journal of Physical Chemistry*

Fazit

Abschließend lässt sich feststellen, dass die drei wesentlichen Projektziele in der Laufzeit des Vorhabens erreicht werden konnten. Besonders hervorheben möchten die Autoren an dieser Stelle die sehr gute Kooperation von Unternehmen und akademischer Forschung. Nur durch diese enge Verzahnung konnte hier zielgerichtet und effizient an den wesentlichen Punkten gearbeitet werden, von der Auswahl

relevanter Leitstrukturen bis hin zu der technischen Umsetzung. Dies zeigt sich auch an gemeinsamen Publikationen, von denen eine bereits erschienen ist und weitere in Planung und Bearbeitung sind. So steht zum Ende dieses Projektes eine optimierte und um wesentliche Endpunkte erweiterte Testbatterie und ein erstes datenbankgestütztes Vorhersage-Tool zur Verfügung. Die damit in diesem Projekt generierten Daten sind richtungweisend für die weitere nötige Forschung hin zu eigensicheren und somit nachhaltigeren Ionischen Flüssigkeiten.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <http://www.dbu.de>

Projektpartner

Dr.rer.nat Karsten Gall
Ionovation GmbH, Osnabrück,
Westerbreite 7
49084 Osnabrück
Niedersachsen

Dr.rer.nat Reinhold Störmann
CHEOPS Dienstleistungs-GmbH, Bremen,
St.-Magnusstraße 51
28217 Bremen

Prof. Dr.-Ing. Jorg Thöming
Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung
Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Umwelttechnologien (UFT)
Universität Bremen
Leobener Str. UFT
Postfach 330440
28359 Bremen

Kooperationspartner aus der Industrie

Dr. Thomas Schubert
Ionic Liquids Technologies GmbH & Co KG (IoLiTec)
Ferdinand-Porsche Str. 5
179211 Denzlingen

Dr.rer.nat Michael M. Schulte
Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
D 64293 Darmstadt

Inhaltsverzeichnis

PROJEKTKENNBLETT	2
PROJEKTPARTNER	6
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	9
1. KURZFASSUNG DES PROJEKTES	11
2. ZIELSETZUNG DES PROJEKTES	12
3. ERZIELTE WISSENSCHAFTLICHE ERGEBNISSE	13
AP 1: ETABLIERUNG UND AUSWEITUNG DER ANALYTIK (UFT)	14
AP 2: ETABLIERUNG NEUER TESTSYSTEME (UFT, IONOVATION GMBH)	15
2.1 <i>Endokrine Wirksamkeit / E-Screen mit MCF-7 Zellen (UFT)</i>	15
2.2 <i>Kontakttest für Feststoffe und wässrige Lösungen mit Arthrobacter globiformis (DIN 38412-L48)</i>	15
2.3 <i>Der Ames-Fluktuationstest</i>	17
2.4 <i>Pflanzliche in vitro – Systeme</i>	19
2.5 <i>Signaltransduktion</i>	19
AP 3: OPTIMIERUNG BESTEHENDER TESTSYSTEME (UFT)	21
3.1 <i>Wachstumshemmtest mit Lemna minor</i>	21
3.2 <i>Erweiterung der Zytotoxizitätstests um neue Endpunkte</i>	21
3.3 <i>Reproduktionshemmtest mit Scenedesmus vacuolatus</i>	23
AP 4: UNTERSUCHUNG VON WIRKMECHANISMEN (UFT, IONOVATION GMBH)	25
4.1 <i>Membrantoxische Wirkungen</i>	25
4.2 <i>Intrazelluläre Glutathiongehalte</i>	30
AP 5 QSAR UND SOFTWARE-TOOL ENTWICKLUNG (UFT, CHEOPS GMBH)	31
4. VERWERTUNGSPLAN DER PROJEKTERGEBNISSE	34
5. FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSERGEBNISSE VON DRITTER SEITE	35
6. ABSCHLIEßENDE DISKUSSION	36
7. LITERATUR	40

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:Arbeits- und Zeitplan des Projektes	13
Abb. 2:Auftragung der Proliferativen Effekte für IM18 Cl	16
Abb. 3:Verfolgung der Dehydrogenaseaktivität	17
Abb. 4:Matrix der untersuchten Ionischen Flüssigkeiten	18
Abb. 5:Mikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz von Hep G2 Zellen nach Inkubation mit Rhodamin B	25
Abb.6: Fluoreszenz Lebenszeitmessungen an NBD-PE Vesikeln	31
Abb. 7:Screenshot des „Prediction-tool“ der Datenbank	34
Tab. 1: Vergleich der log EC50-Werte zwischen Titerplatten und Kolbenversuchen	23
Tab. 2: Ionische Flüssigkeiten für erste Screening-Versuche an isolierten Bilayern	27

Zusammenfassung

Ein zentrales Element der Forderung nach einer nachhaltigen Chemie ist die Entwicklung von Chemikalien mit hoher Eigensicherheit, d.h. Substanzen, in denen schon bei der Syntheseplanung bewusst auf toxikologisch und ökotoxikologisch problematische Strukturelemente verzichtet wird. Ionische Flüssigkeiten stellen in diesem Zusammenhang eine Substanzklasse mit einem vielversprechenden Potenzial für die unterschiedlichsten technologischen Anwendungen dar. Diesem technologischen Vorteil steht jedoch diametral die Problematik der toxikologischen und ökotoxikologischen Bewertung einer solch unüberschaubar großen und dazu noch sehr heterogenen Substanzklasse gegenüber, die nur überwunden werden kann, wenn parallel zu der Optimierung der technologischen Eigenschaften vor allem auch eine Optimierung hin zu einem geringen Gefahrenpotenzial einer Ionischen Flüssigkeit stattfindet.

Die drei wichtigsten Ziele dieses Projektes waren daher zum einen die Optimierung bestehender Testsysteme einer flexiblen Testbatterie hin zu miniaturisierten *in vitro* Screening-Systemen, mit denen sich bei minimiertem Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand große Mengen an Ionischen Flüssigkeiten und prinzipiell beliebig weiterer Chemikalien testen lassen. Zum zweiten sollte im Rahmen dieses Projektes die Testbatterie, in Zusammenarbeit mit der Ionovation GmbH, um neue Testsysteme erweitert werden. Dabei stand hier vor allem die detaillierte Aufklärung möglicher Wirkmechanismen von ILs im Vordergrund. Das dritte Ziel dieses Projektes war die Zusammenstellung der verfügbaren Daten und die Implementierung von Vorhersagealgorithmen zur prospektiven Gefahrenpotenzialanalyse von ILs. Dazu sollte wurde eine „open access“ Datenbank mit einer Funktion zur Abschätzung von Zelltoxizitäten ausgestattet werden, die Produzenten und Anwendern von ILs zur Verfügung gestellt werden soll. Es wurde zunächst die bestehende Analytik erfolgreich optimiert, so dass jetzt die Analytik von Kationen und Anionen von ILs in verschiedenen Matrices möglich ist. Besonders erweitert werden konnte die Analytik durch ionenchromatographische Methoden, die jetzt in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektoren auch einen zuverlässigen und sensitiven Nachweis von nicht-aromatischen Kationen und vor allem von allen gängigen Anionen von ILs ermöglicht. Ebenfalls erfolgreich optimiert werden konnten die aquatischen Testsysteme mit der limnischen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* und der Wasserlinse *Lemna minor*. Dies erlaubt bei gleichzeitiger Erhöhung der getesteten Konzentrationsstufen pro Zeiteinheit einen höheren Durchsatz an Substanzen und Replikaten. Dies erhöht die Effizienz und die statistische Sicherheit der Tests.

Bei den neu hinzugekommenen Testsystemen haben sich vor allem die elektrophysiologischen und fluoreszenzbasierten Untersuchungen der Ionovation GmbH als sehr erfolgreich dargestellt. Mit diesen Methoden konnten erstmals verschiedene Mechanismen der Interaktion von IL Kationen und Anionen mit biologischen Membranen sichtbar gemacht werden und es konnten für die unterschiedlichen Interaktionen so spezifische Struktur-Wirkungsbeziehungen für ILs abgeleitet werden. Des weiteren konnten mit dem E-Screen Assay, dem Umu-Test und dem Test auf chemosensitivierende Wirkung

von ILs drei wichtige zelluläre *in vitro* Testsysteme erfolgreich in die Testbatterie integriert werden, die es erlauben über die rein membranvermittelte Wirkung von ILs hinaus, weitere spezifische Endpunkte zu screenen. Zu den genannten Testsystemen konnten weiterhin der Arthrobacter-Test, der somit auch das Kompartiment Boden für das Screening von ILs zugänglich macht, und verschiedene Enzymhemmtests und subzelluläre Endpunkte (oxidativer Stress) als spezifische Targets in die Testbatterie integriert werden. Nicht erfolgreich integriert werden konnten dagegen die geplanten Pflanzenzellkulturen. Hier erwiesen sich die nötigen Kulturbedingungen und das Handling als zu komplex, um ein robustes Screening-Testprotokoll zu entwickeln.

Zur Entwicklung des Internet-Tools wurden, aufbauend auf der bereits existierenden IL-Datenbank am UFT, von der CHEOPS GmbH in diesem Projekt zunächst Eingabetools für eine SQL-Datenbank für die neu etablierten Testsysteme entwickelt. Diese konnten erfolgreich in die Datenbankstruktur integriert werden. Da sich die Hydrophobie der ILs als ein wesentlicher Parameter bei der Beschreibung der beobachteten toxischen Effekte herausgestellt hat, wurde ein Vorhersage-Tool zur Abschätzung der akuten Zytotoxizität beliebiger Kationen-Anionen Kombinationen aus der Datenbank basierend auf Hydrophobieparametern entwickelt. Dieses Tool konnte von der Cheops GmbH erfolgreich in die Datenbank integriert werden. Es wird - nach der wissenschaftlichen Publikation der zugrundeliegenden Daten - für alle Nutzer öffentlich freigeschaltet.

Um ein solches Tool in Kombination mit der Testbatterie in Zukunft auch als Dienstleistung für Chemikalienproduzenten anbieten zu können, haben sich die Koordinatoren des Projektes in dem Bremer Programm zur Förderung von Unternehmensgründungen durch Hochschulabsolventen/-innen, Young Professionals - „BRUT“ im Rahmen dieses Projektes weiterqualifiziert, um die Chancen und Risiken einer Unternehmensausgründung detailliert zu bewerten. So kann nun zu Projektende ein vollständig ausgearbeiteter Businessplan vorgelegt werden, der neben einer Kostenkalkulation auch eine umfangreiche Marktanalyse beinhaltet. Aufgrund dieser Marktanalyse wurde beschlossen, die Ausgründung vorerst zu verschieben, bis auf regulatorischer Ebene mehr Sicherheit für die Unternehmen über die Nutzbarkeit der durch die Testbatterie erhobenen Daten gewährleistet ist.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die drei wesentlichen Projektziele in der Laufzeit des Vorhabens erreicht werden konnten. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle die sehr gute Kooperation von Unternehmen und akademischer Forschung. Nur durch diese enge Verzahnung konnte hier zielgerichtet und effizient an den wesentlichen Punkten gearbeitet werden, von der Auswahl relevanter Leitstrukturen bis hin zu der technischen Umsetzung.

1. Kurzfassung des Projektes

Ein zentrales Element der Forderung nach einer nachhaltigen Chemie ist die Entwicklung von Chemikalien mit hoher Eigensicherheit, d.h. Substanzen, in denen schon bei der Syntheseplanung bewusst auf toxikologisch und ökotoxikologisch problematische Strukturelemente verzichtet wird. Ionische Flüssigkeiten stellen in diesem Zusammenhang eine Substanzklasse mit einem vielversprechenden Potenzial für die unterschiedlichsten technologischen Anwendungen dar. Aufgrund der Strukturvielfalt innerhalb dieser Substanzklasse lassen sich gezielt Verbindungen für eine technologische Anwendung „designen“. Diesem technologischen Vorteil steht jedoch diametral die Problematik der toxikologischen und ökotoxikologischen Bewertung einer solch unüberschaubar großen und dazu noch sehr heterogenen Substanzklasse gegenüber, die nur überwunden werden kann, wenn parallel zu der Optimierung der technologischen Eigenschaften vor allem auch eine Optimierung hin zu einem geringen Gefahrenpotenzial einer Ionischen Flüssigkeit stattfindet. Bereits heute werden Ionische Flüssigkeiten im Großmaßstab in technologischen Prozessen (z.B. BASIL[®]-Prozess) eingesetzt und finden Anwendung in Verbraucherprodukten, z.B. als Additive in Wandfarben und in Spülmaschinen-Tabs. Für die Zukunft wird eine noch viel breitere Verwendung Ionischer Flüssigkeiten in unterschiedlichsten Verbraucherprodukten erwartet, so dass die bereits heute bestehende Exposition von Mensch und Umwelt gegenüber diesen Substanzen deutlich ansteigen wird. Gemessen daran ist das vorhandene Wissen zur Toxikologie und Ökotoxikologie, d.h. zu dem Gefahrenpotenzial, von Ionischen Flüssigkeiten sehr begrenzt. Das Hauptziel dieses Projektes ist es daher, in einer Pilotstudie aufzuzeigen, wie man in enger Kooperation mit Industriepartnern mit einer systematischen und integrierten Teststrategie - also einer wie unter der neuen EU Chemikalienverordnung REACH geforderten anwendungsorientierten Teststrategie – und einer flexiblen toxikologischen/ökotoxikologischen Testbatterie zu einem nachhaltigen Design von Ionischen Flüssigkeiten mit einem reduzierten Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt kommen kann. Am Ende des Projektes soll dann ein Geschäftsmodell stehen, das die Testbatterie und das zu entwickelnde internetbasierte Software-Tool Entwicklern und Anwendern von Ionischen Flüssigkeiten als Dienstleistung anbieten kann, um von Beginn an gezielt Strukturelemente mit einem geringen Gefahrenpotenzial für ihre Prozesse oder Produkte auszuwählen.

2. Zielsetzung des Projektes

Das zentrale Ziel dieses Projektes ist es, ein vermarktungsfähiges Werkzeug für die toxikologische und ökotoxikologische Gefahrenpotenzialanalyse von Ionischen Flüssigkeiten zu entwickeln, das dann vor allem von KMUs genutzt werden kann, um gezielt nachhaltige Ionische Flüssigkeiten für technologische Anwendungen mit einem reduzierten Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt entwickeln zu können.

Dazu soll mit diesem Projekt eine Pilotstudie durchgeführt werden, um am Beispiel der technologisch vielversprechenden Ionischen Flüssigkeiten zu demonstrieren, wie eine integrale und abgestufte Teststrategie zu neuen, nachhaltigen Industriechemikalien führen kann.

Folgende Einzelzielsetzungen sollen dabei in enger Kooperation mit den Projektpartnern aus der Industrie erreicht werden:

- Anwendungsorientierte Erweiterung der am UFT bestehenden Testbatterie um: a.) wirkmechanismen-basierte Testsysteme, um iterativ die Etablierung von wirkmechanismen-gestützten QSAR-Modellen für Ionische Flüssigkeiten voranzutreiben, und b.) weitere Screening-Tests zur Erfassung von toxikologisch besonders relevanten Endpunkten wie Mutagenität und endokrine Wirksamkeit.
- Optimierung bestehender Testsysteme, um zukünftig das Screening großer Substanzbibliotheken (hinsichtlich der REACH-Fragestellungen) zu ermöglichen.
- Testung von Ionischen Flüssigkeiten in den oben genannten Testsystemen der flexiblen Testbatterie, die hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs Beziehungen und/oder ihrer technischen Relevanz ausgesucht worden sind.
- Parallele Optimierung bestehender und Etablierung neuer theoretischer Vorhersagemodelle (SAR- und QSAR-Modelle) für die jeweiligen Testsysteme zur prospektiven Abschätzung von Gefahrenpotenzialen von Ionischen Flüssigkeiten und für ionische, organische Verbindungen generell auf Basis der generierten Daten.
- Entwicklung eines internetbasierten Software-Tools für die Produzenten Ionischer Flüssigkeiten, mit der die Toxizitäten neuer Verbindungen für die einzelnen Testsysteme der Testbatterie über QSAR-Algorithmen abgeschätzt werden können, und die das baukastenartige Zusammenstellen und Bewerten neuer Ionischer Flüssigkeiten aus bereits getesteten Strukturelementen (Kopfgruppe, Seitenkette und Anion) ermöglicht.

Dem Anwender wird so durch dieses Projekt frühzeitig das Entscheidungskriterium „Eigensicherheit - (Öko-)Toxizität“ an die Hand gegeben. Wenn mehrere Substanzen über ein ähnliches technologisches Leistungsprofil verfügen, so können diejenigen Substanzen ausgewählt werden, von denen man weiß, dass sie weniger toxisch sind.

3. Erzielte wissenschaftliche Ergebnisse

Gemäß dem Arbeits- und Zeitplan gliederte sich das Projekt inklusive einer kostenneutralen Verlängerung von drei Monaten in zwei Projektphasen, die in Abbildung 1 zusammen mit den enthaltenen Arbeitspaketen dargestellt sind. Die erste, Projektphase (18 Monate) beinhaltet die Arbeitspakete (APs) 1 – 5 und hatte die Etablierung neuer Testsysteme und die Weiterentwicklung bestehender Testsysteme der flexiblen Testbatterie, sowie die Entwicklung softwaregestützter Analysetools zum Ziel. In Phase zwei, die die letzten elf Projektmonate umfasste, wurden in AP6 zunächst „Testkits“ von Ionischen Flüssigkeiten zusammengestellt, um vor allem für die neu etablierten Endpunkte „endokrine Wirksamkeit“ und „genotoxische Effekte“ systematische Datensätze erheben zu können. An dieser Stelle fand eine enge Rückkopplung zu AP4 (Wirkmechanismen) und AP5 (QSAR) statt. Ergebnisse aus beiden AP's wurden bei der Auswahl der Substanzen berücksichtigt.

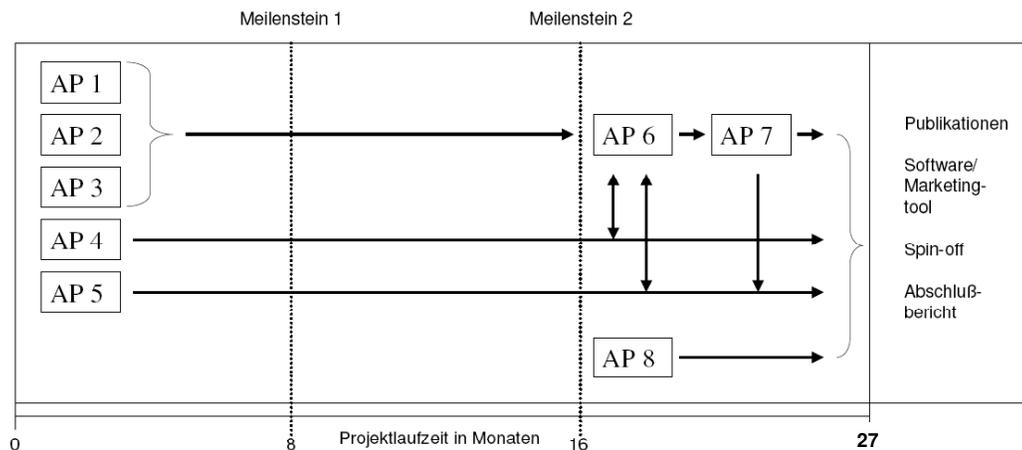


Abb. 1: Graphische Darstellung des Arbeits- und Zeitplan des Projektes mit den enthaltenen Arbeitspaketen und den festgelegten Meilensteinen.

In AP 7 wurden dann die ausgewählten ILs in den jeweils neuen oder optimierten Testsystemen getestet. Das AP 8 beinhaltet schließlich die Ausarbeitung eines Verwertungsplanes für die hier erzielten Projektergebnisse, bzw. für die erweiterte Testbatterie und das Vorhersage-Tool als Dienstleistung. Die Ergebnisse zu AP 8 sind unter Punkt 4 „Verwertungsplan der Projektergebnisse“ zusammengefasst.

Zum Ende des Projektes wird hier nun über die erreichten Ergebnisse aus den einzelnen Arbeitspaketen berichtet und diese diskutiert.

AP 1: Etablierung und Ausweitung der Analytik (UFT)

Die im UFT bestehende Analytik für Ionische Flüssigkeiten konnte durch die Etablierung verschiedener ionenchromatographischer Methoden und Leitfähigkeitsdetektion auf Kationen und Anionen ohne UV-Aktivität erweitert werden. Die verwendeten Methoden konnten für biologische Matrizes statistisch validiert werden. Die Ergebnisse dieses Arbeitspaketes konnten in Form einer Publikation mit dem Titel „Ion chromatographic determination of structurally varied ionic liquid cations and anions - a reliable analytical methodology applicable to technical and natural matrices (Stolte et al.; DOI: 10.1039/C1AY05029J)” in dem Journal “*Analytical Methods*“ zusammengefasst werden.

AP 2: Etablierung neuer Testsysteme (UFT, Ionovation GmbH)

2.1 Endokrine Wirksamkeit / E-Screen mit MCF-7 Zellen (UFT)

Die endokrine Wirksamkeit von Chemikalien stellt neben der akuten Toxizität einen sehr wichtigen Parameter in der Gefahrenpotenzialanalyse, z.B. bei der Identifizierung „besonders Besorgnis erregender Stoffe (SVHC)“ unter REACH dar. Im Rahmen dieses Projektes sollte daher der „E-Screen“-Assay mit der humanen Brustkrebszell-Linie MCF-7 als ein *in vitro* Indikatorassay in die flexible Testbatterie etabliert werden. Das Grundprinzip des „E-Screen“ beruht auf einer Proliferationssteigerung der Zellen (bestimmt über z.B. Farbstoffreagenzien, DNA- und Proteingehalt) durch Östrogene oder östrogenähnliche Substanzen. Hierbei werden die zu untersuchenden Proben in Relation zu einer östrogenfreien Kontrolle und einer Positivkontrolle (17 β -Estradiol) getestet. Die Verwendung der MCF-7 Zell-Linie zur Erfassung endokriner Wirksamkeit bietet gegenüber reinen Rezeptorbindungstests einige Vorteile: so besteht die Möglichkeit der Erfassung einer integralen zellulären Antwort auf östrogenartig wirksame Substanzen, es werden beide Östrogenrezeptoren (ER α also auch ER β) von den Zellen exprimiert, agonistische wie antagonistische Wirkungen können erfasst werden.

Im Rahmen dieses Projektes konnte der E-Screen Assay erfolgreich in die Testbatterie integriert werden. Es steht jetzt ein optimiertes Testprotokoll zur Verfügung, das mit verschiedenen bekannten Referenzsubstanzen validiert ist. In enger Kooperation zu dem AP 6 wurden verschiedene ILs ausgewählt und getestet. Zu Projektende lagen hier noch keine publizierbaren Daten vor.

2.2 Kontakttest für Feststoffe und wässrige Lösungen mit *Arthrobacter globiformis* (DIN 38412-L48)

Der Testorganismus ist *Arthrobacter globiformis* ist ein chemoheterotrophes Bodenbakterium, welches zum Nachweis des ökotoxikologischen Schädigungspotenzials von Chemikalien auf aquatische Sedimente und Böden genutzt wird. Der große Vorteil dieses Kontakttests ist es, dass die Sediment- und Bodenproben ohne vorherige Aufbereitung und somit ohne eventuelle chemische Veränderung eingesetzt werden, wodurch sich realistische Expositionsszenarien simulieren lassen (hohe Relevanz für das Ökosystem). Die Toxizität einer Probe wird durch die Hemmung der bakteriellen Dehydrogenase durch den Umsatz des blauen Farbstoffes Resazurin in das rosafarbene Resorufin photometrisch nachgewiesen und mit einer Kontrollprobe verglichen (siehe Abbildung 3).



Abb. 3: Verfolgung der Dehydrogenasehemmung über einen Farbwechsel

Der Testorganismus *Arthrobacter globiformis* wurde von der "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" in Braunschweig bezogen. Unter Verwendung des DIN 38412-L48 Testprotokolls konnte der Kontakttest erfolgreich im UFT etabliert werden. Bisher wurden unterschiedliche Standardsubstanzen (Atrazin, Triclosan, Carbendazim und Zinksulfat) getestet. In diesen ersten Tests konnten reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt werden. Inzwischen wurden diese Tests statistisch validiert und die Reproduzierbarkeit bestätigt. Die Varianz der erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven liegt dabei unter 10%. Auch dieser Test konnte somit erfolgreich in die flexible Testbatterie integriert werden und wird mittlerweile standardmäßig für die Gefahrenpotenzialanalyse unterschiedlicher Umweltchemikalien durchgeführt. Auch wurde eine Reihe von Ionischen Flüssigkeiten untersucht (Abbildung 4), deren EC_{50} -Werte in einem Bereich von 5 bis 30 mM liegen, der als relativ untoxisch einzuschätzen ist.

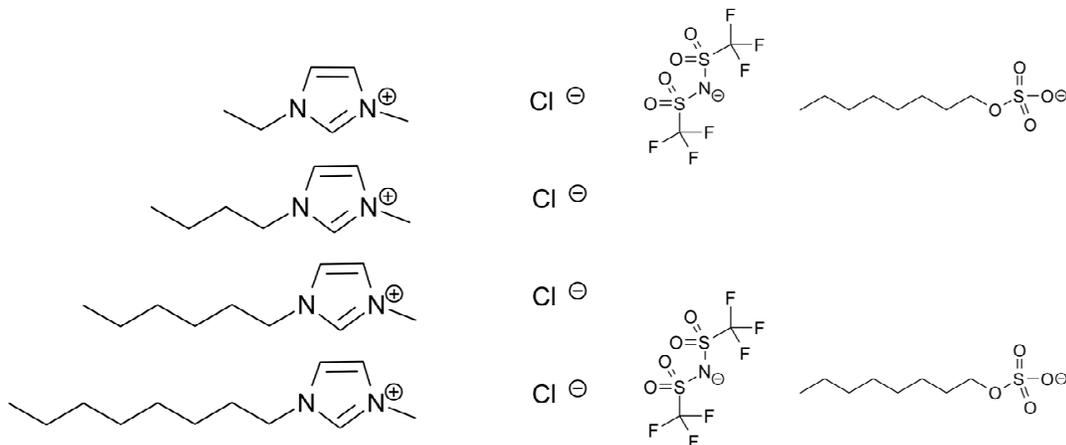


Abb. 4: Matrix der untersuchten Ionischen Flüssigkeiten.

2.3 Der Ames-Fluktuationstest

Neben der endokrinen Wirksamkeit sind genotoxische Effekte einer Substanz ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Identifizierung und Bewertung sogenannter SVHC Substanzen (siehe Abschnitt 2.1). Deshalb war es ein zentrales Ziel dieses Projektes, einen *in vitro* Screening-Test zur Aufklärung möglicher genotoxischer Effekte neu in die Testbatterie am UFT zu etablieren. Vorgesehen dafür war zunächst der Ames-Fluktuationstest nach OECD Guideline 471. Da dieser Test als Mutationstest jedoch darauf ausgelegt ist, das Potenzial einer Substanz eine feste Mutation zu induzieren aufzudecken, ist er für die im UFT verfolgte abgestufte Teststrategie nicht ideal geeignet, da genotoxische Substanzen nicht immer unmittelbar über Mutationen wirken. Es wurde daher im Verlauf des Projektes entschieden, den Ames-Mutationstest durch einen *in vitro* Indikatorstest zu ersetzen. Solche Indikatorstests weisen zunächst alle Schäden, die eine Substanz an der DNA verursachen kann, nach -unabhängig davon, ob aus diesen Interaktionen dann auch manifestierte und vererbare Mutationen entstehen. Aus Sicht einer abgestuften Teststrategie stehen die Indikatorstests also eine Stufe unter den Mutationstest, d.h. sie sind weniger spezifisch, sind daher aber für ein generelles Screening möglicher Wechselwirkungen von Substanzen mit der DNA besser geeignet. In diesem Projekt wurde daher der bakterielle Umu-Test als genotoxischer Indikatorstest erfolgreich am UFT etabliert.

Der Test ist nicht Bestandteil der nach REACH vorgeschriebenen Untersuchungen von Chemikalien. Seit Dezember 1996 ist der Umu-Test jedoch als der erste Genotoxizitätstest auf nationaler Ebene nach DIN67 (DIN 38415-T3(1996) standardisiert worden und bekam später eine internationale Standardisierung nach ISO68 (ISO 13829:2000). Über die Abwasserverordnung (Nr. 410 der AbwasserVO) hat der Umu-Test Eingang in das gesetzliche Regelwerk gefunden.

Die Bezeichnung Umu beruht auf dem *umuC*-Gen, ein ursprünglich in *Escherichia coli* untersuchtes Gen, welches eine besonders fehleranfällige Reparatur („error prone repair“) vornimmt. Außerdem wurde herausgefunden, dass das *umuC*-Operon mehr als andere bekannte SOS-Gene an der Mutagenese beteiligt ist. Seither wird es für die Erkennung von DNA-Schäden verwendet. In diesem Kurzzeit-Genotoxizitätstest wird der gentechnisch veränderte Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 verwendet. Dieser trägt das Multicopy-Gen-Konstrukt *umuC:lacZ*, sowie eine zusätzliche Antibiotika-Resistenz zur einfachen Selektion. Der gentechnisch veränderte Bakterienstamm wird für einen Zeitraum von vier Stunden mit der Chemikalie exponiert. Bei einer genotoxischen Wirkung der Testsubstanz werden die zellulären Reparaturmechanismen (SOS-System) aktiviert, welche die Expression der Reparaturgene veranlassen. Da an das *umuC*-Gen das Reportergen *lacZ* gekoppelt ist, wird gleichzeitig β -Galactosidase exprimiert. Dieses ist ein leicht zu quantifizierendes Enzym, da es das farblose Substrat 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in einen gelben Farbstoff umsetzen kann. Durch diese Farbreaktion kann über eine photometrische Messung indirekt die Aktivität des DNA-Reparatursystems ermittelt werden. Die differenziert zu bewertende Zytotoxizität der Probe wird gleichzeitig durch die Wachstumsrate der Bakterien bestimmt.

Um den Test auf Funktionalität und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden zunächst verschiedene Referenzchemikalien ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass diese Chemikalien unterschiedliche genotoxische Wirkmechanismen besitzen und bereits positive Ergebnisse im Umu-Test erzielten. Ausgesucht wurden Acridin Orange, Ethidiumbromid und Paraquat, welche mit der DNA interkalieren. Ethidiumbromid hat wie die ionischen Flüssigkeiten ein quaternäres N-Atom und ein negativ geladenes Anion. Paraquat (1,1'-dimethyl-(4,4'-bipyridium)dichlorid) ist ein Herbizid und hat eine starke Ähnlichkeit mit pyridiniumbasierten ILs. Seine Fähigkeit zur Interkalation mit der DNA erklärt einige seiner mutagenen Effekte. Des Weiteren wurde 1-Bromopentan als Alkylierungsreagenz und das in der DIN 38415-T3(1996) und ISO 13829:2000 als positive Referenz verwendete 4-Nitrochinolin-N-Oxid (4-NQO) auf Grund seines breiten Spektrums an genotoxischen Wirkmechanismen ausgewählt. Mit diesen Referenzsubstanzen konnte ein validiertes Testprotokoll erarbeitet werden, mit welchem dann wieder gezielt ausgewählte ILs getestet wurden.

Für die ionischen Flüssigkeiten mit aromatischem System in der Kopfgruppe kann eine Interkalation in die DNA erwartet werden, zumal hier ähnlich wie bei den Referenzsubstanzen Paraquat und Ethidiumbromid auch quaternäre Ammoniumverbindungen vorliegen. Außerdem kann durch die Hydrophobie einer Substanz und unterschiedlichen Wechselwirkungen verschiedener Anionen, die Bioverfügbarkeit in der Zelle beeinflusst werden. Die Hydrophobie der ionischen Flüssigkeiten lässt sich über Veränderungen der Länge der Seitenkette beeinflussen. In einer Studie von Docherty *et al.* (2006) zeigten die beiden ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-3-Methyl-Imidazolium-Bromid und 1-Octyl-3-Methyl-Imidazolium-Bromid eine lineare Abhängigkeit der Induktionsrate zur Konzentration im Ames-Fluktuationstest. So wurde auf Basis dieser Erkenntnisse in AP 6 ein Test-Kit für den Umu-Test konstruiert. Für die Tests wurden die Leitstrukturen 1-Butyl-3-Methyl-Imidazolium (IM14) und das 1-Octyl-3-Methyl-Imidazolium (IM18) ausgewählt. Diese wurden jeweils mit den Anionen Chlorid und $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ kombiniert. Durch diese Zusammenstellung kann sowohl der erwartete Mechanismus der Kopfgruppe als auch die unterschiedlichen Effekte der Anionen und der Hydrophobie überprüft werden.

Die hier getesteten Imidazolium-ILs konnten die von Docherty *et al.* (2006) im Ames-Test gefundenen Genotoxizitäten für IM14 Cl und IM18 Cl nicht bestätigen. Es sind jedoch weitere Tests mit Konzentrationen, die gerade noch eine Wachstumsrate von 0,5 erzeugen notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren. Zur Überprüfung des genotoxischen Potenzials von IM18 Cl sind ebenfalls weitere Tests geplant, für niedrigere, nicht-zytotoxische Konzentrationen. Außerdem ist eine Erweiterung des Testkits um weitere Kopfgruppen wie Chinolinium-, Dimethylaminopyridinium- und Pyridinium-Kationen, die aufgrund ihres größeren aromatischen Systems besser in die DNA interkalieren könnten, geplant. Eine Publikation dazu ist in Vorbereitung.

2.4 Pflanzliche *in vitro* – Systeme

Zu Projektbeginn wurden zwei unterschiedliche Pflanzenzellen als Testspezies ausgewählt. Die primären Zellkulturen von Weizen (*Triticum aestivum*) und Soja (*Glycine max*) - als Vertreter von mono- und dikotyledonen Spezies - konnten von der "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" in Braunschweig bezogen und bereits erfolgreich am UFT in Kultur genommen werden.

Bei der Etablierung eines standardisierten Testprotokolls zeigte sich jedoch, dass diese Zellkulturen auch unter optimierten Bedingungen keine stabilen und reproduzierbaren Wachstumskurven erzielen. Somit ist ein valider Test mit diesen Zellkulturen am UFT im Moment nicht realisierbar. Die Prüfung weiterer Pflanzenzellkulturen zeigte, dass die nötigen Protokolle und Kulturbedingungen hier noch aufwändiger sind und diese sich damit für das angestrebte schnelle Screenen nicht eignen. Die Zelltests an Pflanzenzellen konnten somit im Rahmen dieses Projektes nicht erfolgreich in die Testbatterie integriert werden. Anstelle eines Tests mit Pflanzenzellkulturen wurde ein Test mit dem Wasserfloh *Daphnia magna* etabliert (nach OECD Richtlinie). Dieser Test erlaubt im Screening-Maßstab die Evaluation verschiedener toxikologisch relevanter Endpunkte (z.B. Wachstum, Reproduktion, abnormes Verhalten) und ist auch unter REACH ein geforderter Standardtest. Im Rahmen dieses Projektes wurde Reproduzierbarkeit der Testergebnisse mittels der Referenzchemikalie Kaliumdichromat (OECD Standard) überprüft und eine Reihe von cholinbasierten ILs mit unterschiedlichen Anionen (Methylsulfat, Ethylsulfat und Chlorid) untersucht. Keine der getesteten ILs zeigte einen toxischen Effekt in der höchsten getesteten Konzentration von 100mg/L. Eine Publikation dieser Ergebnisse ist in Vorbereitung.

2.5 Signaltransduktion

In diesem Arbeitspaket wurde der Einfluss von ausgewählten ionischen Flüssigkeiten auf wichtige metabolische Vorgänge in Zellen untersucht. Damit sollten neben den integralen Endpunkten wie generelle Zytotoxizität auch mögliche spezifische Wirkmechanismen von ILs aufgeklärt werden. Dazu wurden Versuche zum Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf den Energiestoffwechsel und auf den Redoxstatus der Zellen als zwei wesentliche metabolische Targets durchgeführt. Da Zellen in Kultur aufgrund limitierter Sauerstoffversorgung ihren Energiebedarf fast ausschließlich über die Glykolyse und nicht über den Zitratzyklus decken, wurden als Targetproteine für die Inhibitionstests die Schlüsselenzyme der Glykolyse, die Glukose-6-phosphatdehydrogenase und die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase ausgewählt. Für beide Enzyme wurde ein erstes Testkit bestehend aus folgenden ionischen Flüssigkeiten getestet: 1-Hexylpyridinium Chlorid (Py6 Cl), 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Chlorid (IM12 Cl), 1-Hexyl-3-Methylimidazolium Chlorid (IM16 Cl) und 4-(Dimethylamino)-1-hexylpyridinium Chlorid (Py6-4NMe2 Cl). Alle untersuchten ionischen Flüssigkeiten zeigen für unterschiedliche Inkubationszeiten (4h – 8h) und unterschiedliche Testkonzentrationen (10µM – 1000µM) keine signifikante Hemmwirkung auf eines der beiden Enzyme.

Zusätzlich wurde für das Testkit aus obigen Ionischen Flüssigkeiten das Potenzial zur Generation von intrazellulärem oxidativem Stress untersucht. Dafür wurden primäre Astrocyten für unterschiedliche Inkubationszeiten (4h – 8h) mit verschiedenen Konzentrationen der Ionischen Flüssigkeiten (10µM – 1000µM) inkubiert und zu den jeweiligen Zeitpunkten die Konzentration von intrazellulärem Glutathion und seinem Disulfid als Marker für den zellulären Redox-Haushalt bestimmt. Ergänzend wurde die Hemmwirkung der ausgewählten Ionischen Flüssigkeiten auf die Glutathion-Reduktase, einem Schlüsselenzym für die Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotenzials, untersucht. Für beide Experimente konnten keine signifikanten Effekte der getesteten Ionischen Flüssigkeiten in den untersuchten Astrocyten beobachtet werden.

Diese Experimente zeigten, dass die Enzym- und Glutathion-Tests erfolgreich in die Testbatterie etabliert wurden und reproduzierbar mit Ionischen Flüssigkeiten durchgeführt werden können. Ein um verschiedene Kopfgruppen und Anionen erweitertes Testkit, das in der 2. Projektphase mit diesen Testsystemen untersucht wurde, lieferte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse, die auf eine akute Interaktion der getesteten ILs in dem getesteten Konzentrationsbereich (10µM – 1000µM) und für eine Inkubationsdauer von maximal 48h mit den hier erfassten subzellulären Strukturen hinweisen.

In dem zweiten Teil dieses APs sollte mittels Rezeptorbindungstests aus der Pharmaforschung der Einfluss von ILS auf die zelluläre Signaltransduktion untersucht werden. Dieses Paket gliedert sich den in AP 4 durchgeführten Tests zur Aufklärung von molekularen Wirkmechanismen der ILs an. Da die in diesem AP geplanten Tests sehr aufwändig sind, wurde ein gestuftes Vorgehen beschlossen. Da alle bisherigen Experimente zur toxischen Wirkung von ILs die Zellmembran als primäres molekulares Target vermuten lassen, wurde der Fokus zunächst auf die detaillierte Aufklärung der Membraninteraktionen gelegt (siehe AP 4). Nach den Ergebnissen zu den Enzymhemmtests in diesem AP und den interessanten Ergebnissen in AP 4 wurde für die 2. Projektphase beschlossen, keine Rezeptorbindungstests durchzuführen, sondern die Ressourcen der Ionovation GmbH voll auf die detaillierte Aufklärung der Membranwechselwirkungen der ILs zu legen. Diese Ergebnisse sind ausführlich in AP 4 vorgestellt.

AP 3: Optimierung bestehender Testsysteme (UFT)

3.1 Wachstumshemmtest mit *Lemna minor*

Der Wachstumshemmtest mit *Lemna minor* wurde im UFT bisher nach einer Testvorschrift des DIN AK, 2000 durchgeführt. Dabei entstehen relativ große Mengen an Abfall, da pro Probe 150 mL Kulturmedium (versetzt mit der zu untersuchenden Substanz) zum Einsatz kommen. Der Test wurde dahingehend optimiert, dass das Testvolumen um ca. eine Größenordnung reduziert werden konnte indem mit 6-Loch-Zellkulturplatten gearbeitet wurde. Auch geht die Reduktion des Testvolumens zusätzlich mit einer Erhöhung des Durchsatzes an Testsubstanzen einher, da nun weniger Platz in den Kultivationskammern benötigt wird (zuvor der limitierende Faktor bei dem Umfang eines Versuchansatzes). Die Empfindlichkeit des Testorganismus und die Reproduzierbarkeit im miniaturisierten Versuchsaufbau wurden anhand von ausgewählten Standard-ILs weiter untersucht und mit Ergebnissen aus den 150 mL Versuchen verglichen (siehe Tabelle 2). Die Zahl der Replikate wurde erhöht und die Tests somit auch statistisch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit validiert. Eine weitere statistische Absicherung erfolgte durch Experimente mit Referenzsubstanzen (Atrazin, Triclosan und Carbendazim).

Seit ca. einem Jahr wird am UFT der Wachstumshemmtest mit *Lemna minor* ausschließlich in der miniaturisierten Form durchgeführt und liefert seither reproduzierbare Ergebnisse zu aktuellen Forschungschemikalien wie z.B. zu Ionischen Flüssigkeiten, Nanopartikeln oder Konservierungsmitteln.

Tab. 1: Vergleich der log EC₅₀-Werte zwischen Titerplatten und Kolbenversuchen. Die Standardabweichungen liegen für beide Testgefäße in einem sehr guten Bereich von 0,05 bis 0,1.

Substanzname	Laborkürzel	log EC ₅₀ [µmol/L] Titerplatte	log EC ₅₀ [µmol/L] Kolben
1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide	IM14 (CF ₃ SO ₂) ₂ N	2,49	2,52
1-butyl-3-methylimidazolium 1-octylsulfate	IM14 OcSO ₄	2,59	2,61
1-decyl-3-methylimidazolium chloride	IM1-10 Cl	1,23	1,20
4-(dimethylamino)-1-butylpyridinium chloride	Py4-4NMe ₂ Cl	1,00	0,53
4-butyl-4-methylmorpholinium bromide	Mor14 Br	3,20	3,11
1-butyl-1-methylpiperidinium bromide	Pip14 Br	2,84	2,47
1-butylpyridinium chloride	Py4 Cl	2,55	2,32
1-butyl-1-methylpyrrolidinium chloride	Pyr14 Cl	2,36	2,16
butylethyl-dimethylammonium chloride	N1124 Cl	1,62	0,83

3.2 Erweiterung der Zytotoxizitätstests um neue Endpunkte

Bisher ist ein 48h Zytotoxizitätstest an einer Rattenleukämiezelllinie (IPC-81) und einer humanen Leberkarzinomzelllinie (HepG2) im UFT etabliert. Dieser Test basiert auf der photometrisch analysierten Bildung eines Farbstoffes in Zellen mit noch intaktem Stoffwechsel und ist somit ein Maß für die Zellvitalität nach 48h Inkubation mit den zu testenden Substanzen. Zusätzlich wurde ein Test zur akuten Toxizität an den obigen

Zellkulturen etabliert. Bei diesem Test wird nach kurzen Inkubationszeiten (Minuten bis einige Stunden) die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase ins umgebende Medium gemessen. Dies ist ein Maß für massive Membranschädigungen der Zellen und somit für ein Absterben der Zellen durch Nekrose. Ein Testkit aus Imidazolium-basierten ILs unterschiedlicher Kettenlänge konnte auch in diesem Testsystem für kurze Inkubationszeiten den allgemeinen Trend bestätigen, dass mit steigender Alkyl-Kettenlänge, d.h. mit steigender Hydrophobie des Kations einer IL die Toxizität zunimmt. Die mit diesem Test nachweisbaren Membranschäden weisen ebenfalls wieder auf biologische Lipidmembranen als primäre Targets der bisher getesteten ILs hin. Mehr dazu in der Diskussion zu AP 4.

Als weiterer zytotoxischer Endpunkt wurde ein Fluoreszenzassay zur Aufklärung einer möglichen chemosensitivierenden Wirkung von ILs erfolgreich in die Testbatterie etabliert. Chemosensitivierende Stoffe blockieren spezielle Exportproteine, sogenannte „Multi Xenobiotic Resistance Proteins“ (MXRPs), die normalerweise für ein schnelles Ausschleusen von Giftstoffen aus Zellen sorgen. So können durch die Kombination von chemosensitivierenden und anderen Umweltgiften diese in den Zellen akkumulieren. Eine solche Akkumulation toxischer Substanzen kann tödliche Folgen für die Zelle und damit eine gesundheitsschädigende Wirkung auf den Organismus hervorrufen. Besonders eine Chemosensitisation durch nicht akut toxische Substanzen stellt ein Problem dar, da die unerwarteten negativen Effekte zunächst keine erkennbaren Ursachen offenbaren. So können Chemosensitizer in der Umwelt auch für synergistische Effekte von Mischungen verschiedener Toxine verantwortlich sein, obwohl sie als Einzelsubstanz keine Effekte hervorrufen und daher in einer Gefahrenpotenzialanalyse als unbedenklich charakterisiert werden würden. Eine ebenfalls große Gefahr geht von der Inhibition der Efflux-Transporter durch persistente Umweltgifte aus, da diese resistent gegen biologische Degradation, sowie Umweltdegradation sind und ihre Wirkung damit über Jahre anhalten kann. Da ILs sich bisher überwiegend als schwer abbaubar in der Umwelt gezeigt haben, wurde im Rahmen dieses Projektes mit den bereits etablierten humanen Hep G2 Zellen erfolgreich ein *in vitro* Screening-Test zur Detektion möglicher chemosensitivierender Eigenschaften von ILs in die Testbatterie integriert. In Anlehnung an bereits veröffentlichte Untersuchungen zur Aktivität der Efflux-Transporter (Kurelec et al., 2000; Luckenbach and Epel, 2005; Smital and Kurelec, 1998; Stevenson et al., 2006) werden dabei das MXRP-Substrat Rhodamin B (RhB) als Fluoreszenzmarker und der MDR1 P-GP- und MRP-Inhibitor Verapamil als spezifischer Modulator der Efflux-Aktivität eingesetzt. Die Theorie, durch welche eine gegebenenfalls eintretende Chemosensitisation gemessen werden soll, besteht darin, die Zellen zunächst mit dem fluoreszierenden RhB zu beladen, sie entweder zuvor, gleichzeitig oder im Anschluss dem Inhibitor Verapamil bzw. einer zu testenden Substanz auszusetzen, um im Folgenden über die über die Zeit in den Zellen verbleibende Intensität der Fluoreszenz (siehe Abb. 5) Rückschlüsse auf die Transporter-Aktivität ziehen zu können.

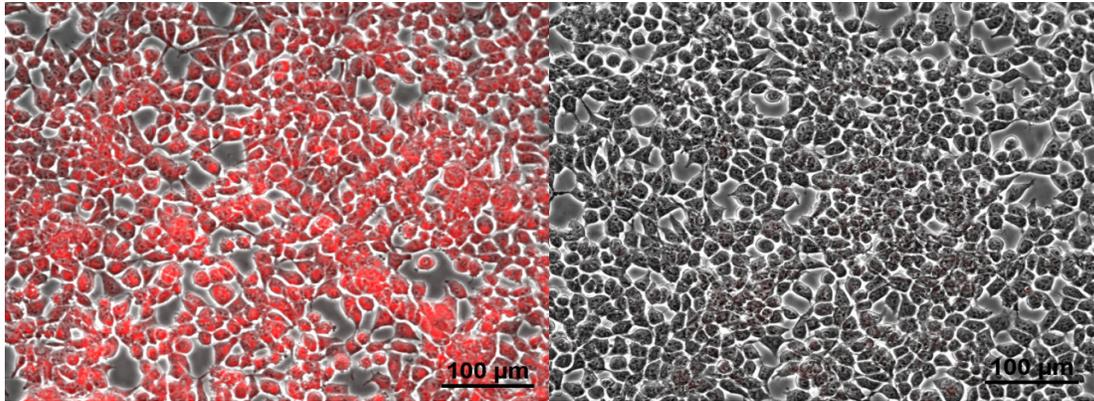


Abb. 5: Mikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz von RhB bei 20-facher Vergrößerung nach einer 40-minütigen Inkubation mit einer 20 µM RhB-Lösung (links) bzw. einer im Anschluss folgenden 10-minütigen Efflux-Phase unter Exposition mit reinem RPMI-Medium (rechts); die Zelldichte beträgt 1,5 * 10⁵ Zellen pro Well.

Anhand der Ergebnisse einiger auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen basierender Studien, können vor allem aromatische Ringsysteme, Basizität, Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften und zunehmende Hydrophobie eine inhibitorische Wirkung auf die zellulären Efflux-Transporter hervorrufen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten der Pyridiniumverbindungen Py6 (CF₃SO₂)₂N, Py6 Cl und Py8 Cl zu bekannten MXRP-Inhibitoren, sowie ihrer erhöhten Zytotoxizität für die HEP G2-Zelllinie, könnten diese Substanzen eine chemosensitivierende Wirkung auf die HEP G2-Zellen ausüben und wurden als Testkit in dem etablierten Assay untersucht. Hierbei zeigten sich bisher jedoch keine signifikanten Effekte der getesteten ILs auf die MXR-Proteine der Hep G2 Zellen.

3.3 Reproduktionshemmtest mit *Scenedesmus vacuolatus*

Der Reproduktionshemmtest mit der einzelligen, limnischen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* (Stamm 211-15, SAG (Stammsammlung für Algen), Universität Göttingen) hat sich als ein sehr sensibles Testsystem erwiesen und ist damit einer der „Schlüsseltests“ in der ökotoxikologischen Testbatterie im UFT. Daher soll im Rahmen dieses Projektes eine Optimierung dieses Biotests im Hinblick auf den möglichen zu testenden Probenumfang erfolgen, auch wieder gekoppelt an eine Reduktion der Testvolumina.

Bisher fanden die Versuche mit einer synchronisierten Algenkultur in temperierten Wasserbecken (28 °C) statt mit einem Probenumfang von 30 Röhrchen (Volumen 20 mL) pro Anlage. Es stehen 2 Anlagen zur Durchführung von Tests zur Verfügung. Um nun den Testdurchsatz an Substanzen zu erhöhen und den Platzbedarf, den die Anlagen in Anspruch nehmen, zu reduzieren wurde ein miniaturisierter Testaufbau mit 6-Loch (Volumen 10 mL) und 24-Loch-Multiplatten (Volumen 2,5 mL) erprobt. In Experimenten mit Standardsubstanzen (Atrazin, Triclosan und Carbendazim) konnte belegt werden, dass die Durchführung in 6-Loch-Platten reproduzierbarere Ergebnisse liefert als die Versuche in 24-Loch Platten. Auch wenn die Testdurchführung selbst auf 6-Lochplatten übertragen werden

konnte, bleibt die Kultivierung der Algen weiterhin an die bisherige Aquariumsanlage und CO₂-Versorgung gekoppelt, welche beide sehr wartungsintensiv und fehleranfällig sind.

Daher wurde parallel zu den Versuchen mit 6-Lochplatten und in Kooperation mit der Abteilung „Pflanzen- und Umweltforschung“ an der Universität Göteborg (Dr. Marianne Matzke, Prof. Dr. Thomas Backhaus) ein dort entwickelter Test in Zellkulturflaschen am UFT etabliert. Die Reproduzierbarkeit dieses Aufbaues und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Literaturdaten wurden Anhand von Untersuchungen an Referenzverbindungen überprüft.

Diese Umstellung des Testprotokolls geht insgesamt mit einer Reduzierung des Arbeitsaufwandes um ca. 50% einher (kein aufwändiges Reinigen der Aquarien und Testgefäße, vereinfachtes Arbeiten unter sterilen Bedingungen, Wegfall der CO₂-Begasung) und der Platzbedarf an knapper Laborfläche wurde um ca. 70% reduziert.

AP 4: Untersuchung von Wirkmechanismen (UFT, Ionovation GmbH)

4.1 Membrantoxische Wirkungen

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, die Einflüsse von Ionischen Flüssigkeiten auf biologische Membranen zu untersuchen, da diese als primäres und hauptsächliches Target der zytotoxischen Wirkung verschiedener ILs vermutet werden. Dazu wurde zunächst am UFT in AP 6 ein „Testkit“ (siehe Tabelle 3) verschiedener ionischer Flüssigkeiten zusammengestellt. Die Auswahl der ILs repräsentiert dabei Variationen in der Seitenkettenlängen, der Kopfgruppe und der Anionen.

Tab. 2: Ionische Flüssigkeiten für erste Screening-Versuche an isolierten Bilayern. Angegeben ist der Substanzname nach IUPAC-Nomenklatur und die im Text verwendeten Abkürzung.

Substanzname IUPAC	Im Text verwendete Abkürzung
1-Ethyl-3-methylimidazolium Chlorid	IM12 Cl
1-Hexyl-3-methylimidazolium Chlorid	IM16 Cl
1-Ethyl-3-hexylimidazolium Chlorid	IM1-10 Cl
1-Hexyl-3-methylimidazolium Bis(trifluormethylsulfonyl)amid	IM16 (CF ₃ SO ₂) ₂ N
1-Hexyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborat	IM16 BF ₄
1-Hexyl-3-methylimidazolium Tris(trifluoromethylsulfonyl)methanid	IM16 (CF ₃ SO ₂) ₃ C
1-Hexyl-3-methylimidazolium Trifluoridotris(pentafluorethyl)phosphat	IM16 (C ₂ F ₅) ₃ PF ₃
1-Ethyl-3-methylimidazolium Bis(trifluormethylsulfonyl)amid	IM12 (CF ₃ SO ₂) ₂ N
1-Butyl-4-(dimethylamino)pyridinium Chlorid	Py4-4NMe ₂ Cl
1-Hexyl-4-(dimethylamino)pyridinium Chlorid	Py6-4NMe ₂ Cl

Die „Bilayer-Technik“ ist eine Methode, mit der man Ströme durch einzelne Ionenkanäle oder Membranporen messen kann. Dazu wird zunächst über einem kleinen Loch definierter Größe (z.B. 100 µm), welches sich zwischen zwei Halbkammern befindet, eine Lipiddoppelschicht aufgebracht. Dadurch sind die beiden mit Salzlösungen gefüllten Halbkammern zunächst elektrisch isoliert. Eine (unspezifische) Beeinträchtigung oder Zerstörung der Lipiddoppelschicht verringert den Widerstand der Lipiddoppelschicht, bzw. erhöht die Leitfähigkeit. Es wurde daher untersucht, ob durch die Zugabe ionischer Flüssigkeiten das Auftreten von Ionenströmen induziert werden kann. Der Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die Membranstabilität wurde an künstlichen Lipidmembranen (Bilayer) aus Sojabohnenextrakten (Asolectin, Fraktion IV-S) untersucht.

Die Messlösung in der Messkammer bestand auf beiden Seiten des Bilayers aus 250 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, pH 7.0 (Tris).

In der 3. Projektphase wurden zwei Teilaspekte aus den beiden ersten Projektphasen (siehe letzter Zwischenbericht) detaillierter untersucht. Der Einfluss verschiedener Pyridiniumsalze auf unterschiedliche künstliche Bilayermembranen wurde elektrophysiologisch untersucht. Ergänzend zu den bereits durchgeführten Untersuchungen mit dem fluoreszenzmarkiertem Phosphatidylethanolamin-Derivat (PE-Derivat) (atto647N-Dihexadecanoyl-phosphatidylethanolamin) wurden Experimente mit seitenkettenmarkiertem PE (6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-PE) durchgeführt, um eine mögliche Interaktion der Ionischen Flüssigkeit mit der Bilayermembran, d.h. eine An- oder Einlagerung, zu untersuchen.

Ähnlich, wie es bereits mit den Imidazoliumsalzen beobachtet wurde, beeinflusst auch bei den Pyridiniumsalzen die Länge der hydrophobe Seitenkette am N1-Atom die Wirkung auf die künstliche Lipiddoppelschicht (Bilayer), d.h., eine längere Seitenkette führt eher zu messbaren spezifischen Ionenströmen. Die Effekte scheinen aber generell weniger stark ausgeprägt zu sein und hängen auch von der Lipidzusammensetzung des Bilayers ab.

Die Versuche wurden mit 4 verschiedenen Lipidzusammensetzungen durchgeführt; 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) und 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in verschiedenen Verhältnissen (POPE/POPC 80:20, POPE/POPC 70:30, POPE/POPC 50:50) und mit Bilayermembranen aus Asolectin. Asolectin stellt eine undefinierte Mischung eines Sojabohnenextraktes dar, mit einem Phosphatidylcholinanteil von ca. 25%. Alle Ionischen Flüssigkeiten wurden standardmäßig aus einer 500 mM Stammlösung zu der cis-Seite der Bilayerkammer gegeben.

Py2-4NMe2 Br und Py4-4NMe2 Cl hatten keinerlei spezifischen oder unspezifischen Einfluss auf den Bilayer, d.h. es wurden auch mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 mM keine Ionenströme detektiert. Die bereits durchgeführten Versuche mit Py6-4NMe2Cl an Asolectinmembranen wurden um Versuche an den POPE/POPC-Membranen ergänzt. Wie bereits mit den kürzerkettigen Py2- und Py4-Derivaten festgestellt, konnten mit POPE/POPC 50:50 und POPE/POPC 70:30 als Membranbestandteile keine Beeinträchtigung der Bilayerstabilität durch 50 mM Py6-4NMe2 Cl in der cis-Kammer festgestellt werden. Bildet man dagegen einen Bilayer mit POPE und POPC im Verhältnis 80:20, sind mit 50 mM Py6-4NMe2 Cl in der der cis-Kammer zwar kleine, aber eindeutig identifizierbare Ionenströme zu registrieren. Hierbei handelt es sich nicht um eine unspezifische Destabilisierung des Bilayers, sondern um von Kationen getragene Ströme, was anhand des Umkehrpotenzials von kleiner als -100 mV bei symmetrischen Ionenverhältnissen im Messpuffer (250 mM KCl) leicht ersichtlich ist. Diese Ergebnisse lassen die bereits früher durchgeführten Experimente mit inkonsistenten Resultaten am Asolectinbilayer erklären. Das von uns verwendete Asolectin hat einen Phosphatidylcholinanteil von ca. 25% und einen nicht näher definierten Anteil anderer Lipide und Membranbestandteile. Aufgrund der Batch-zu-Batch-Variabilität hat man mal einen für das Py6-4NMe2-Kation permeablen Bilayer, in anderen Versuchsreihen dagegen erwies sich das Lipidgemisch als impermeabel.

Wenn man davon ausgeht, dass mit abnehmender Kettenlänge am N1-Atom des Pyridiniumringes auch die membranschädigende Wirkung abnimmt, sollte man erwarten,

dass Py1-4NMe2 I, ebenso wie Py2-4NMe2 Br und Py4-4NMe2 Cl, den Bilayer nicht beeinträchtigt. Die Beobachtung war aber eine andere. Ähnlich wie mit Py6-4NMe2 Cl beobachtete man eine von der Lipidzusammensetzung abhängige Permeabilität des Bilayers für diese ionische Flüssigkeit. Mit dem in diesen Versuchen verwendeten Asolectin-Batch wurden nur sehr kleine Ströme von -4.25 ± 1.75 pA bei einer Potenzialdifferenz von -60 mV gemessen. Mit POPE/POPC 50:50 lagen die Ströme auf einem nur geringfügig höheren Niveau (-26.5 ± 19.5 pA). Erhöhte man aber den POPE-Anteil, konnten robuste Ionenströme gemessen werden. Mit POPE/POPC 70:30 betrug der mittlere Strom bei -60 mV -815 ± 535 pA, mit POPE/POPC 80:20 -821 ± 828 pA. Am POPE/POPC 80:20 Bilayer wurde die Strom-Spannungs-Beziehung näher untersucht. Mit zunehmender Py1-4NMe2 I Konzentration steigt die Stromamplitude. Ebenso verschiebt sich das Gleichgewichtspotenzial von 7 mV bei einer Konzentration von 5 mM, über 36 mV bei 10 mM, 70 mV bei 20 mM auf über 100 mV bei einer Konzentration von 50 mM Py1-4NMe2 I in der cis-Kammer. Dies zeigt, dass, ähnlich wie es bei den Versuchen mit Py6-4NMe2 Cl gezeigt wurde, ein hochselektiver Ionenstrom fließt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Py6-4NMe2 Cl handelt es sich hier aber um einen anionenselektiven Strom. D.h., es permeiert nicht das Py1-4NMe2-Kation durch die Membran. Es ist bekannt, dass Lipiddoppelschichten für I_3^- permeabel sein können. Offensichtlich beobachten wir hier also einen Strom, der überwiegend durch I_3^- getragen wird. 20 mM Py1-4NMe2 I in der cis-Kammer induzierte den beschriebenen anionenselektiven Strom. Stellt man durch Zugabe von 20 mM zur trans-Kammer wieder symmetrische Ionenverhältnisse her, verschiebt sich die Strom-Spannungs-Beziehung und wir messen ein Umkehrpotenzial, welches bei 0 mV liegt. Py1-4NMe2 I lässt sich sowohl aus der cis-Kammer, als auch aus der trans-Kammer wieder vollständig auswaschen.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass IM16 (CF₃SO₂)₃C und IM16 (C₂F₅)₃PF₃ offensichtlich ein komplexeres Verhalten zeigen und direkt mit der Bilayermembran interagieren. Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen an DHPE-atto647N markierten Bilayermembranen wurden nun um Experimente mit NBD-PE markierten Membranen ergänzt. Im Gegensatz zum kopfgruppenmarkierten DHPE-atto647N ist am NBD-PE die Lipidseitenkette fluoreszenzmarkiert, so dass sich diese nicht an der Lipid-Wasser-Grenzschicht, sondern in der Lipidumgebung befindet. Zudem hängt die Fluoreszenzlebenszeit von NBD-PE in starkem Maße von der Dielektrizitätskonstante ϵ der Umgebung ab. Bei einem angenommenen ϵ von 2 im Inneren einer Lipiddoppelschicht und einem typischen ϵ ionischer Flüssigkeiten von 10-20 sollte daher eine Veränderung der Lebenszeit erwartet werden, wenn sich die ionische Flüssigkeit in die Membran einlagert.

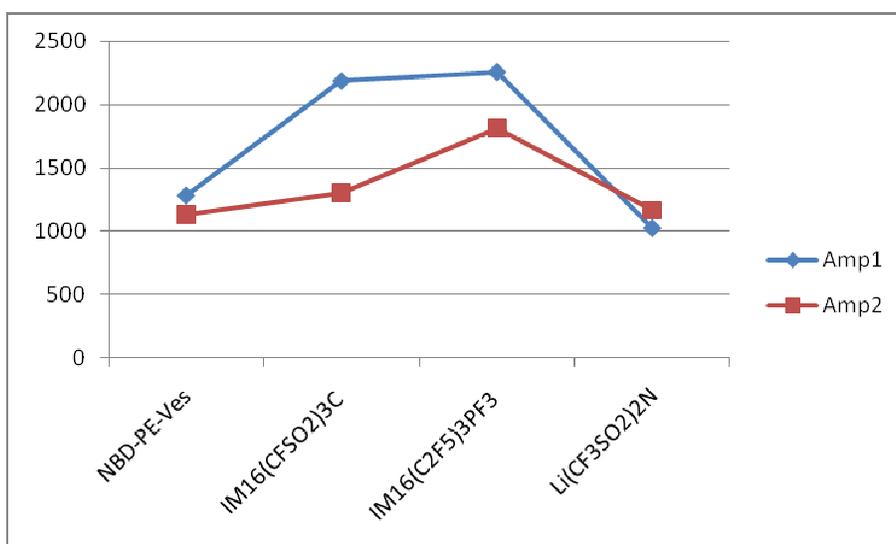
Als Kontrolle wurde Li (CF₃SO₂)₂N gewählt, da dieses in den vergangenen Experimenten zwar einen großen und spezifischen Anionenstrom induzierte aber keine Änderungen in der kapazitiven Transiente hervorrief und es daher keine Hinweise darauf gibt, dass diese Substanz direkt mit der Bilayermembran interagiert.

Zunächst wurden die Emissionsspektren NBD-PE markierter POPE/POPC 80:20 Vesikel nach Anregung bei 469 nm verglichen. Das Emissionsmaximum lag bei den NBD-PE Vesikeln bei 536 nm. Mit 1% Methanol im Messpuffer, welches der maximalen Konzentration nach Zugabe der ionischen Flüssigkeiten aus einer methanolischen Stammlösung

entspricht, kam es nur zu einer leichten Verschiebung des Emissionsmaximums (539 nm). 1 mM Li (CF₃SO₂)₂N im Messpuffer, einer Konzentration, welche bereits sehr große Anionenströme induzierte, führte nicht zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums, nur zu einer leichten Verringerung der Amplitude. Dieses Ergebnis entsprach damit den Erwartungen, da nicht von einer direkten Interaktion mit der Lipiddoppelschicht auszugehen war.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach Zugabe von 250 μ M IM16 (CF₃SO₂)₃C. Es konnte keine signifikante Veränderung im Emissionsspektrum beobachtet werden. Mit 250 μ M IM16 (C₂F₅)₃PF₃ im Messpuffer dagegen beobachtete man eine deutliche Reduktion der maximalen Amplitude und eine Rechtsverschiebung des Emissionsspektrums mit einem Emissionsmaximum bei 550 nm. Dieses Ergebnis war insofern etwas überraschend, da IM16 (CF₃SO₂)₃C in den elektrophysiologischen Messungen zu einem stärkeren Anstieg der Kapazität des Bilayers und zu einem langsameren Abklingen der kapazitiven Transienten führte als IM16 (C₂F₅)₃PF₃. Auf der anderen Seite unterstützen diese Ergebnisse aber die Hypothese, dass IM16 (C₂F₅)₃PF₃ sich in die Membran einlagert und so die biophysikalischen Eigenschaften verändert.

Als weiterer Parameter wurde die Fluoreszenzlebenszeit t analysiert. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei der Analyse der Emissionsspektren; POPE/POPC 80:20 Vesikel in 250 mM KCl Messpuffer. Die gewonnenen Daten wurden mit einem 2-Komponentenfit ausgewertet. D.h., es wurden 2 unterschiedliche Lebenszeiten beobachtet, der Fluoreszenzfarbstoff sieht also zwei verschiedene Umgebungen. Warum dies so ist, darüber lässt sich zu diesem Zeitpunkt keine Aussage treffen. Die grafische Darstellung ist in Abbildung 7 zu sehen.



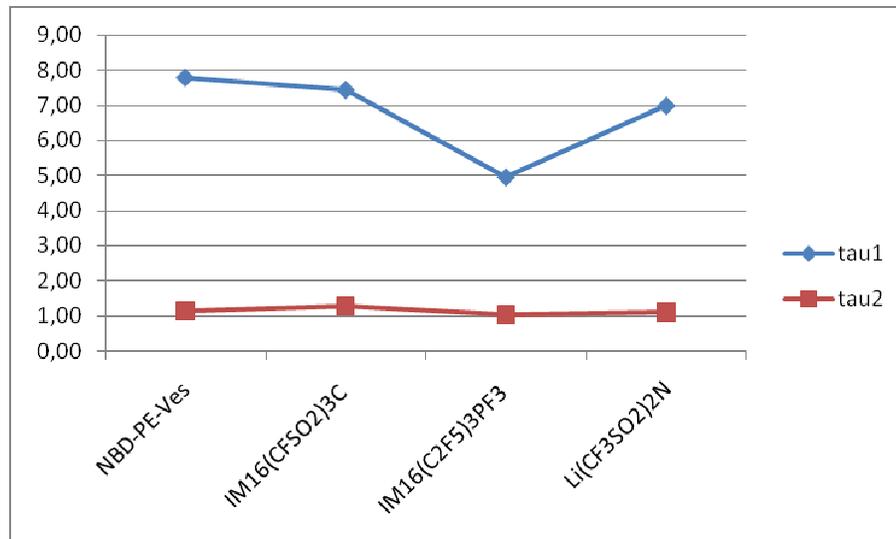


Abb. 6: Lebenszeitmessungen an NBD-PE Vesikeln. In der oberen Abbildung ist Amplitude aufgetragen, in der unteren Abbildung die Fluoreszenzlebenszeit in ns.

Die Ergebnisse decken sich mit den vorigen Resultaten. IM16 (C2F5)3PF3 im Messpuffer führt zu einer deutlichen Reduktion von t_2 . Offensichtlich wird also durch die Anwesenheit dieser Ionischen Flüssigkeit die Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffes verändert. In den anderen Versuchen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Somit kann gesagt werden, dass zumindest für IM16 (C2F5)3PF3 gezeigt werden konnte, dass diese Ionische Flüssigkeit die Membraneigenschaften verändert, wahrscheinlich durch Einlagerung in die Lipiddoppelschicht und somit auch die elektrophysiologischen Phänomene (Kapazitätserhöhung vornehmlich durch Anstieg der Dielektrizitätskonstante) zu erklären sind.

Abschließend lassen sich für das gesamte Arbeitspaket folgende wichtige Schlussfolgerungen ziehen: Die Kombination aus elektrophysiologischen Messungen an Lipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung mit fluoreszenzbasierten Mikroskopie-Techniken konnte erfolgreich eingesetzt werden, um im Detail die Interaktionen von verschiedenen ausgewählten IL Kationen und Anionen mit biologischen Membranen aufzuklären. Dabei konnten vier mögliche Wirkmechanismen unterschieden werden: i.) passive Diffusion von Kationen und Anionen durch die Membran, abhängig von der Membranzusammensetzung, ii.) starke Interaktion mit der Lipiddoppelschicht der hydrophoben ILs, was zur Zerstörung der Bilayerstruktur führt, iii.) Einlagerung von IL Kationen in die Membran, was zu einer fluoreszenzspektroskopisch messbaren Veränderung der Membraneigenschaften führt und iv.) Anlagerung von IL Kationen und Anionen von außen an die Membran, was zu den beobachteten Effekten der kapazitiven Ströme führt. Die beobachteten Effekte lassen für die ausgewählten Testkit ILs auch hier wieder die Hydrophobie als dominierenden Parameter zur Beschreibung der Membraninteraktionen vermuten. Um den Anteil der positiv geladenen Substrukturen der IL Kationen an den Wechselwirkungen noch besser charakterisieren zu können, sind hier über das Projekt hinaus noch weitere Messungen mit Membranen geplant, die sich in ihren Phosphatidylserin-

Anteilen unterscheiden. Da das Phosphatidylserin ein negativ geladenes Membranlipid darstellt, könnte man so den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen quantifizieren.

Besonders erwähnenswert ist außerdem, dass hier Effekte für IL Kationen und Anionen separat als auch für verschiedene Kombinationen nachgewiesen wurden. Diese Untersuchungen liefern so detailliertere Hinweise zur Erklärung der in anderen Testsystemen beobachteten Kombinationseffekte von ILs. Zu diesem AP ist eine gemeinsame Publikation in Vorbereitung, in der diese Aspekte ausführlich diskutiert werden sollen.

4.2 Intrazelluläre Glutathiongehalte

Das Testsystem zur Erfassung der Effekte verschiedener ILs auf den Glutathionstoffwechsel und damit auf den Redox-Haushalt von Zellen ist bereits etabliert und im Rahmen der Testbatterie zur toxikologischen Bewertung einer Substanzklasse von Bioziden erfolgreich eingesetzt worden. Es sind Messungen an ausgewählten Ionischen Flüssigkeiten in einer Astrocytenkultur erfolgreich durchgeführt worden (siehe oben Punkt 2.5).

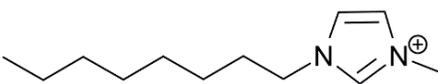
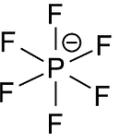
AP 5 QSAR und Software-Tool Entwicklung (UFT, CHEOPS GmbH)

Für die neue etablierten, bzw. die modifizierten Testsysteme wurden von der CHEOPS GmbH Eingabemasken für die der Datenauswertung zugrundeliegenden SQL-Datenbank erstellt, die es erlauben automatisiert aus in die Datenbank eingespeisten Rohdaten Dosis-Wirkungs-Kurven zu berechnen, und diese (ebenfalls automatisch) in die IL-eco (<http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de/>) Datenbank zu importieren. Außerdem wurde die Ionische Flüssigkeiten-Datenbank gemeinsam von CHEOPS und vom UFT weiterentwickelt und für potenzielle Kunden mit neuen Suchfunktionen ausgestattet wie z.B. der Suche nach physikalisch-chemischen oder toxikologischen Eigenschaften. Diese Datenbank bietet somit bereits eine ideale Plattform zur Implementierung der geplanten weiteren Softwaretools zur Abschätzung von Gefahrenpotenzialen neuer Ionischer Flüssigkeiten.

Die Auswertung der bisher vorliegenden Daten zur Toxizität und zu der Interaktion von Ionischen Flüssigkeiten mit biologischen Membranen zeigen, dass für die oben angesprochenen Vorhersagetools besonders Modelle interessant sind, die die Beschreibung von Kombinationswirkungen von verschiedenen Kationen und Anionen von Ionischen Flüssigkeiten erlauben, und die die Membraninteraktionen abbilden können. Es läuft daher aktuell die Entwicklung von QSAR-Algorithmen, die auf Basis des Modells der Konzentrationsadditivität die toxische Kombinationswirkung von Kationen und Anionen ionischer Flüssigkeiten vorhersagen können. Aus Basisdaten von 100 Kationen und 30 Anionen lassen sich nun zum Projektabschluss z.B. die Zytotoxizitäten (IPC-81 Zellen) von demnach 3000 denkbaren Kombinationen von Kation und Anionen berechnen, die neue potenzielle Ionische Flüssigkeiten bilden könnten. Somit ist eine erste Abschätzung der Toxizität schon vor der tatsächlichen Synthese einer Chemikalie möglich. Ähnliche Abschätzungen sind auch für die Organismen *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus* und *Lemna minor* durchführbar. Das „Prediction-Tool“ der Datenbank (siehe Abbildung 8) ist zurzeit noch nicht für externe Benutzer zugänglich, aber es ist geplant dies parallel zu einer wissenschaftlichen Veröffentlichung freizuschalten.

Home Results Predictions

Prediction of cytotoxicity

IM18

Predicted cytotoxicity data for IM18 PF6

	calculated according to: $EC^{1+2}_{50} = EC^2_{50} \cdot EC^1_{50} / (EC^1_{50} + EC^2_{50})$		Reference
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 89 μmol·L ⁻¹ [77.4 - 106] EC ₅₀ = 30.3 mg·L ⁻¹ [26.4 - 36]	calculated	UFT
	Value	Comment	Reference
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 91.2 μmol·L ⁻¹ EC ₅₀ = 31 mg·L ⁻¹		Ranke et al., 2007
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 91.2 μmol·L ⁻¹ [77.6 - 107] EC ₅₀ = 31 mg·L ⁻¹ [26.4 - 36.5]		Ranke et al., 2004
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 91.9 μmol·L ⁻¹ [78.4 - 109] EC ₅₀ = 31.3 mg·L ⁻¹ [26.7 - 37.1]	n = 108 replicates	UFT

Cytotoxicity data for IM18 Cl

EC ¹ ₅₀	Value	Comment	Reference
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 103 μmol·L ⁻¹ [91.4 - 118] EC ₅₀ = 23.9 mg·L ⁻¹ [21.1 - 27.2]		UFT

Cytotoxicity data for Na PF6

EC ² ₅₀	Value	Comment	Reference
IPC-81 leukemia cells cytotoxicity	EC ₅₀ = 657 μmol·L ⁻¹ [507 - 1010] EC ₅₀ = 110 mg·L ⁻¹ [85.1 - 170]		UFT

References [Back to the top](#)

UFT
Centre for Environmental Research and Sustainable Technology (UFT)

Ranke et al., 2007
Ranke, Johannes; Müller, Anja; Bottin-Weber, Ulrike; Stock, Frauke; Stolte, Stefan; Arning, Jürgen; Störmann, Reinhold; Jastorff, Bernd (2007) "Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity.", *Ecotoxicol. Environ. Safety* 67, 430-438

Ranke et al., 2004
Ranke, J.; Möller, K.; Stock, F.; Bottin-Weber, U.; Poczbalt, J.; Hoffmann, J.; Ondruschka, B.; Filser, J.; Jastorff, B. (2004), "Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and *WST-1* cell viability assays.", *Ecotoxicol. Environ. Safety* 58, 396-404

Abb. 7: Screenshot des „Prediction-tool“ der Datenbank

Die Deutsche Bundesstiftung Umwelt fördert ein Projekt mit dem Titel „Umweltsicherheit von Chemikalien verbessern - Vorhersage der Eigensicherheit von ionischen Flüssigkeiten und deren Implementierung in ein Programmpaket (AZ 26664-31)“ welches in enger Verzahnung zu EIFL durchgeführt worden ist und sich an vielen Stellen Synergien bei dem Generieren und dem Austausch von Daten ergeben haben. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ingo Krossing von der Universität Freiburg und mit der COSMOlogic GmbH aus Leverkusen konnten hier über quantenchemische Berechnung wichtige umweltrelevante Eigenschaften z.B. Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol-Wasser oder Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten für Ionische Flüssigkeiten berechnet werden. Auch konnte der Hydrophobieparameter, der zuvor über HPLC Messungen bestimmt wurde und sehr gut mit der akuten Toxizität von Ionischen Flüssigkeiten korreliert, berechnet werden. Somit lassen sich nun für die meisten Verbindungen der Substanzklasse ausschließlich „in silico“ viele physikalisch-chemische Eigenschaften und auch deren akute Zytotoxizität gegenüber IPC-81 Zellen oder *Scenedesmus vacuolatus* abschätzen. Diese Berechnungen erfolgten überwiegend durch ein von der COSMOlogic GmbH vertriebenes Softwarepaket, welches um die Berechnungen zu Ionischen Flüssigkeiten ergänzt wird.

Mittels dieses Softwarepaketes lassen sich nun gezielt fehlende experimentelle Daten der IL-eco Datenbank auffüllen was (u.a.) für die nächsten drei Jahre ein drittmittelfinanziertes Vorhaben der CHEOPS GmbH und des UFT ist.

Die Datenbank stellt insgesamt somit Herstellern/Anwendern in der Phase des Designs neuer Ionischer Flüssigkeiten die Möglichkeit zur Verfügung, in einer Art Baukastensystem Strukturelemente wie Kopfgruppe, Seitenkette und Anion von potenziellen Ionischen Flüssigkeiten neu zu kombinieren, um Strukturen mit geringem ökotoxikologischen Gefahrenpotenzial (bezogen auf die in der Testbatterie angebotenen biologischen und biochemischen Systeme) zu finden.

4. Verwertungsplan der Projektergebnisse

Da ein Projektziel die Vermarktung (AP 8) der hier gewonnenen Ergebnisse in einer Dienstleistungseinheit „Testbatterie“ ist, haben sich die beteiligten Mitarbeiter des UFT, wie bereits im ersten Zwischenbericht dargestellt, für das Bremer BRUT Förderprogramm beworben. BRUT steht für das „Bremer Programm zur Förderung von Unternehmensgründungen durch Hochschulabsolventinnen, Young Professionals und innovative Handwerksmeisterinnen“. Im Rahmen dieses Programms konnte nun ein Geschäftsmodell für eine Ausgründung in Form einer GmbH & Co. KG am UFT entwickelt werden und es wurde ein erster Businessplan mit mehreren Gründungsszenarien und einem Planungshorizont für die ersten fünf Geschäftsjahre erstellt (siehe Anhang). Mit der Bremer Aufbaubank erfolgten ebenfalls erste Gespräche zur Finanzierung eines solchen Gründungsvorhabens auf Basis des anhängenden Businessplans.

Ziel einer solchen Ausgründung ist es, sowohl die Expertise der Ionovation GmbH, die von der CHEOPS GmbH entwickelte und betreute Softwareplattform als auch die Testbatterie und die Expertise für das nachhaltige Chemikaliendesign im UFT als gemeinsames Dienstleistungspaket für Unternehmen anbieten zu können. Die Details zu der Beteiligung der Ionovation GmbH und der Cheops GmbH an einer Ausgründung aus dem UFT müssen noch unter den Projektpartnern abgestimmt werden. Eventuell werden sich daraus noch Änderungen an der geplanten Rechtsform einer Gründung ergeben. Die im Anhang präsentierten Daten zeigen aber, dass eine solche Ausgründung prinzipiell betriebswirtschaftlich möglich und sinnvoll ist.

In der letzten Projektphase wurde dazu eine ausführliche Kundenanalyse und Befragung an 20 KMUs aus der Zielgruppe der Chemikalienhersteller und Importeure durchgeführt. Das Ergebnis dieser Umfrage zeigte ein grundsätzliches Interesse an einem solchen Dienstleistungsangebot, allerdings bestand keine Bereitschaft bei den Unternehmen, konkret Geld für diese Dienstleistung auszugeben und ihre Daten zu den Chemikalien offenzulegen. Ein wesentlicher Faktor dafür scheint die momentan noch nicht eindeutige Lage bei der Verwendung solcher Daten bei der Zulassung unter REACH zu sein. Erst wenn hier auf regulatorischer Ebene über die Akzeptanz solcher alternativer (im Vergleich zu den REACH Standardtestanforderungen) Screening-Daten entschieden ist, wäre ein ausreichend großer Nachfragemarkt für die erweiterte und optimierte Testbatterie vorhanden. Es wurde daher nach Auswertung der Umfrage zu Projektende beschlossen, die Ausgründung eines Spin-off Unternehmens vorerst zu vertagen. Bei den im Businessplan berechneten Minimalinvestitionskosten von ca. 500.000 € (siehe Anhang) für eine Gründung, scheint das unternehmerische Risiko momentan zu groß. Trotzdem war die Teilnahme der Projektkoordinatoren an dem BRUT Programm eine wertvolle Fortbildung, die zur Generierung wirtschaftlicher Expertise am UFT geführt hat. Außerdem liegt mit dem anhängenden Businessplan ein fundiertes und extern bewertetes Gründungskonzept vor, das bei geänderter Markteinschätzung jederzeit wieder aktiviert werden kann.

5. Forschungs- und Entwicklungsergebnisse von dritter Seite

Es liegen nach Kenntnis aller beteiligten Kooperationspartner zu Projektende keine Forschungs- und Entwicklungsergebnisse von dritter Seite vor, die die hier durchgeführten und geplanten Arbeiten betreffen oder die hier avisierten Projektziele in Frage stellen würden.

6. Abschließende Diskussion

Die drei wichtigsten Ziele dieses Projektes waren zum einen die Optimierung bestehender Testsysteme einer flexiblen Testbatterie hin zu miniaturisierten *in vitro* Screening-Systemen, mit denen sich bei minimiertem Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand große Mengen an Ionischen Flüssigkeiten und prinzipiell beliebig weiterer Chemikalien testen lassen. Das strategische Ziel solcher Testsysteme ist eine schnelle und möglichst breite Erfassung von basalen akuten Effekten auf zellulärer Ebene. In einer abgestuften Teststrategie, wie sie immer nötig ist, um viele Substanzen effizient zu bewerten, spielen solche Testsysteme eine essenzielle Rolle, da sich mit ihnen erste Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen identifizieren lassen und so eine Priorisierung von Substanzen für weiterführende, komplexere Tests möglich und rationell begründbar wird.

Zum zweiten sollte im Rahmen dieses Projektes die Testbatterie, in Zusammenarbeit mit der Ionovation GmbH, um neue Testsysteme erweitert werden. Dabei stand hier vor allem die detaillierte Aufklärung möglicher Wirkmechanismen von ILs im Vordergrund. Aufbauend auf vorhandenen toxikologischen Daten und der daraus folgenden Interpretation, dass viele ILs primär mit biologischen Membranen interagieren, sollte hier vor allem die Wechselwirkung von ILs mit Lipid-Doppelschichten mit weiteren zellfreien Methoden untersucht werden. Zusätzlich sollten neue Testsysteme in die Testbatterie integriert werden, die ein Screening auf mögliche besonders besorgniserregende Eigenschaften wie östrogene Wirksamkeit, genotoxische Effekte und das chemosensitivierende Potenzial von ILs liefern können.

Das dritte Ziel dieses Projektes war die Zusammenstellung der verfügbaren Daten und die Implementierung von Vorhersagealgorithmen zur prospektiven Gefahrenpotenzialanalyse von verschiedenen Kombinationen aus Kationen und Anionen von ILs. Dazu sollte ein datenbankbasiertes Internet Software-Tool entwickelt werden, dass Produzenten und Anwendern von ILs zur Verfügung gestellt werden soll.

Zur Validierung und Interpretation aller hier vorgestellten Testsysteme ist eine robuste Analytik essentiell. Daher wurde zunächst die bestehende Analytik erfolgreich optimiert, so dass jetzt die Analytik von Kationen und Anionen von ILs in verschiedenen Matrices möglich ist. Besonders erweitert werden konnte die Analytik durch ionenchromatographische Methoden, die jetzt in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektoren auch einen zuverlässigen Nachweis und sensitiven Nachweis von nicht-aromatischen Kationen und vor allem von allen gängigen Anionen von ILs ermöglicht. Diese Weiterentwicklung ist bereits erfolgreich in dem Fachjournal „Analytical Methods“ (siehe Anhang) publiziert worden.

Ebenfalls erfolgreich optimiert werden konnten die aquatischen Testsysteme mit der limnischen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* und der Wasserlinse *Lemna minor*. Beide Testsysteme konnten bisher nur in relativ aufwändigen 15mL bzw. 150mL Ansätzen in Glasgefäßen genutzt werden. Für den Test mit der Wasserlinse ist es gelungen die Volumina und Bedingungen so zu optimieren, dass der Test jetzt in 6-Loch-Zellkulturplatten im 10mL Maßstab durchgeführt werden kann. Dies erlaubt bei gleichzeitiger Erhöhung der getesteten Konzentrationsstufen pro Zeiteinheit einen höheren Durchsatz an Substanzen und

Replikaten. Dies erhöht die Effizienz und die statistische Sicherheit des Testes. Für die Algen ist es zum einen gelungen, den Ansatz ebenfalls auf 6-Loch-Zellkulturplatten zu übertragen, allerdings bleibt dabei die Anzüchtung der Algen in der Stammkultur weiterhin sehr aufwändig. Zum anderen konnte nach einer Versuchsvorschrift der Universität Göteborg ein alternatives Testdesign übernommen werden, das den gesamten Arbeits- und Zeitaufwand um ca. 50% reduziert. Beide neuen Testansätze mit den Algen erlauben daher ein effizienteres Screenen von Substanzen. Die Validität der neu etablierten Testprotokolle für die Tests mit der Wasserlinse und mit der Grünalge wurde sowohl mit literaturbekannten Referenzsubstanzen, als auch mit ILs, für die nach den alten Protokollen schon Daten erhoben wurden, verifiziert. Die Abweichungen für beide Testorganismen zu den alten Protokollen liegen hier unter 10%, was für biologische Testsysteme ein ausgezeichneter Wert ist.

Bei den neu hinzugekommenen Testsystemen haben sich vor allem die elektrophysiologischen und fluoreszenzbasierten Untersuchungen der Ionovation GmbH als sehr erfolgreich dargestellt. Mit diesen Methoden konnten erstmals verschiedene Mechanismen der Interaktion von IL Kationen und Anionen mit biologischen Membranen sichtbar gemacht werden und es konnten für die unterschiedlichen Interaktionen so spezifische Struktur-Wirkungsbeziehungen für ILs abgeleitet werden. Diese Ergebnisse werden auch weiterhin Gegenstand von Forschungen zur IL Toxizität sein und sie sollen schnellstmöglich publiziert werden. Des Weiteren konnten mit dem E-Screen Assay, dem Umu-Test und dem Test auf chemosensitivierende Wirkung von ILs drei wichtige *in vitro* Testsysteme erfolgreich in die Testbatterie integriert werden, die es erlauben über die rein membranvermittelte Wirkung von ILs hinaus, weitere spezifische Endpunkte zu screenen. Besonders die Endpunkte zur östrogenen Wirksamkeit und zur Genotoxizität haben dabei hohe Aktualität für die Chemikaliengesetzgebung unter REACh. Die ersten Testkits, die mit diesen neuen Testsystemen untersucht wurden deuten an, dass für die ILs im Allgemeinen großer Forschungsbedarf auf diesen Gebieten besteht. Zu den genannten Testsystemen konnten weiterhin der Arthrobacter-Test, der somit auch das Kompartiment Boden für das Screening von ILs zugänglich macht, und verschiedene Enzymhemmtests und subzelluläre Endpunkte (oxidativer Stress) als spezifische Targets in die Testbatterie integriert werden. Hier zeigten sich mit den ausgewählten ILs jedoch keine Auffälligkeiten. Nicht erfolgreich integriert werden konnten dagegen die geplanten Pflanzenzellkulturen. Hier erwiesen sich die nötigen Kulturbedingungen und das Handling als zu komplex, um ein robustes Screening-Testprotokoll zu entwickeln. Gedacht waren diese Pflanzenzellkulturen als Testsysteme zur Priorisierung von ILs für aufwändigere Pflanzenwachstumstests an z.B. Kresse oder Weizen. Alternativ wurde nun ein Test an dem Wasserfloh *Daphnia magna* mit aufgenommen, da dieser Test unmittelbar für REACh relevant ist.

Um das hier generierte Wissen zu ILs höherer Eigensicherheit auch unmittelbar den Produzenten und Anwendern von ILs zur Verfügung stellen zu können, ist ein datenbankgestütztes Tool nötig. Dieses soll zum einen die generierten Datensätze nach dem Baukastenprinzip in einem einheitlichen Format speichern und anschließend über verschiedene Vorhersagealgorithmen toxikologisch relevante Eigenschaften von neuen

Kombinationen von Kationen und Anionen abschätzbar machen. Dazu wurden, aufbauend auf der bereits existierenden IL-Datenbank am UFT, von der CHEOPS GmbH in diesem Projekt zunächst Eingabetools für eine SQL-Datenbank für die neu etablierten Testsysteme entwickelt. Diese konnten erfolgreich in die Datenbankstruktur integriert werden und erlauben nun auch für weitere Testsysteme die automatische Generierung von Dosis-Wirkungskurven und die Berechnung toxikologisch relevanter Daten wie EC_{50} Werte aus diesen Rohdaten. Da sich wie oben diskutiert die Hydrophobie der bisher getesteten ILs als ein wesentlicher Parameter bei der Beschreibung der beobachteten toxischen Effekte herausgestellt hat, wurde dann ein Vorhersage-Tool zur Abschätzung der akuten Zytotoxizität beliebiger Kationen-Anionen Kombinationen aus der Datenbank basierend auf Hydrophobieparametern entwickelt. Dieses Tool konnte von der Cheops GmbH erfolgreich in die Datenbank integriert werden es wird nach der wissenschaftlichen Publikation der zugrundeliegenden Daten für alle Nutzer öffentlich freigeschaltet. Besonders erwähnenswert ist hier noch die erfolgreiche Kooperation mit der Universität Freiburg und dem UFT, wo in einem anderen von der DBU geförderten Projekt diese Vorhersagemöglichkeiten gerade um quantenchemische Berechnungen erweitert werden. Die aktuellen Arbeiten zeigen dabei bereits eine sehr gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment, so dass es in naher Zukunft möglich sein wird, auch für noch völlig unbekannte IL Strukturen deren Gefahrenpotenzial vorherzusagen.

Um ein solches Tool in Kombination mit der Testbatterie in Zukunft auch als Dienstleistung für Chemikalienproduzenten anbieten zu können, haben sich die Koordinatoren des Projektes in dem Bremer Programm zur Förderung von Unternehmensgründungen durch Hochschulabsolventen/-innen, Young Professionals - „BRUT“ im Rahmen dieses Projektes weiterqualifiziert, um die Chancen und Risiken einer Unternehmensausgründung detailliert zu bewerten. So kann nun zu Projektende ein vollständig ausgearbeiteter Businessplan vorgelegt werden, der neben einer Kostenkalkulation auch eine umfangreiche Marktanalyse beinhaltet. Aufgrund dieser Marktanalyse wurde beschlossen, die Ausgründung vorerst zu verschieben, bis auf regulatorischer Ebene mehr Sicherheit für die Unternehmen über die Nutzbarkeit der durch die Testbatterie erhobenen Daten gewährleistet ist. Sollte dieses Investitionshemmnis abgebaut sein sehen die Projektpartner hier großes Potenzial für die Markteinführung der oben skizzierten Dienstleistung. Die Eckdaten und Überlegungen dafür liegen mit dem hier angehängten Businessplan dann bereits vor und können schnell umgesetzt werden.

Abschließend lässt sich also feststellen, dass die drei wesentlichen Projektziele in der Laufzeit des Vorhabens erreicht werden konnten. Besonders hervorheben möchten die Autoren an dieser Stelle die sehr gute Kooperation von Unternehmen und akademischer Forschung. Nur durch diese enge Verzahnung konnte hier zielgerichtet und effizient an den wesentlichen Punkten gearbeitet werden, von der Auswahl relevanter Leitstrukturen bis hin zu der technischen Umsetzung. Dies zeigt sich auch an gemeinsamen Publikationen, von denen eine bereits erschienen ist und weitere in Planung und Bearbeitung sind. So steht zum Ende dieses Projektes eine optimierte und um wesentliche Endpunkte erweiterte Testbatterie und ein erstes datenbankgestütztes Vorhersage-Tool zur Verfügung. Die damit in diesem

Projekt generierten Daten sind richtungweisend für die weitere nötige Forschung hin zu eigensicheren und somit nachhaltigeren Ionischen Flüssigkeiten.

7. Literatur

Docherty, KM; Hebbeler, SZ; Kulpa, CF (2006): An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test, *Green Chemistry*, **8**, 560-567.

Evans, K.O. (2008): Supported Phospholipid Bilayer Interaction with Components Found in Typical Room-Temperature Ionic Liquids – a QCM-D and AFM Study, *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, 498 – 511.

Kurelec, B; Smital, T; Pivcevic, B; Eufemia, N; Epel D (2000): Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers, *Ecotoxicology*, **9**, 307-327.

Luckenbach, T; Epel, D. (2005): Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters, *Environmental Health Perspect*, **113**, 17-24.

Smital, T; Kurelec, B. (1998): The Activity of Multixenobiotic Resistance Mechanism Determined by Rhodamine B-Efflux Method as a Biomarker of Exposure, *Marine Environmental Research*, **46**, 443-447.

Stevenson, CN; Manus-Spencer, LA ; Luckenbach, T ; Luthy, RG ; Epel, D. (2006) New perspectives on perfluorochemical ecotoxicology: inhibition and induction of an efflux transporter in the marine mussel, *Mytilus californianus*, *Environmental Science and Technology*, **40**, 5580-5585.