

Aus dem Walther Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München
kommissarischer Vorstand Prof. Dr. P. Eyer

Untersuchung der Toxizität von Umweltchemikalien in gentechnisch veränderten Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katharina Fuchs
aus
Regensburg
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Richter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Götz

Priv. Doz. Dr. K. Radon, MSc

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2006

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	IV	
1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHER HINTERGRUND	2
2.1	Chemische Kanzerogenese	2
2.1.1	Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene	2
2.2	Das Phasen-Konzept des Fremdstoffmetabolismus	3
2.2.1	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)	3
2.2.1.1	Cytochrom P450 1A1	6
2.2.1.2	Cytochrom P450 1B1	6
2.2.1.3	Cytochrom P450 1A2	7
2.2.2	N-Acetyltransferasen	7
2.3	Exogene Kanzerogene	10
2.3.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	10
2.3.1.1	Vorkommen	10
2.3.1.2	Aufnahme und Verteilung	10
2.3.1.3	Biotransformation	11
2.3.1.4	Toxizität	11
2.3.1.5	Verwendete polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	12
2.3.1.5.1	Benzo[a]pyren	12
2.3.1.5.2	Dibenzo[a,l]pyren	13
2.3.1.5.3	Pyren als Modellsubstanz	14
2.3.2	Aromatische Amine	14
2.3.2.1	Vorkommen der untersuchten aromatischen Amine	14
2.3.2.2	Biotransformation und Fremdstoffmetabolismus der aromatischen Amine	15
2.3.2.3	Toxizität	18
2.3.2.4	Verwendete Aromatische Amine	18
2.3.2.4.1	4-Aminobiphenyl	19
2.3.2.4.2	ortho-Toluidin	19
2.3.2.4.3	meta-Toluidin	20
2.4	Nachweis von kanzerogenen Wirkungen	20
2.4.1	Die Zelllinie V79MZ	20
2.4.2	Bewertung von Stoffgemischen	22
2.4.3	Cytotoxizität	22
2.4.3.1	MTT Assay	22
2.4.4	Genotoxizität: Nachweis von Mutationen <i>in vitro</i>	23
2.4.4.1	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-(HPRT)-Test zur Erfassung der Mutagenität	23
2.4.5	Nachweis von Chromosomenschäden <i>in vitro</i> : Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet Assay) zur Erfassung genotoxischer Effekte	25
2.4.6	Kovalente Bindung von Fremdstoffen an die DNA	26
2.4.6.1	³² P-Postlabeling-Verfahren zum Nachweis von DNA-Addukten	26
3	AUFGABENSTELLUNG	28
4	MATERIAL UND METHODEN	29
4.1	Laborgeräte	29
4.2	Verbrauchsmaterialien	30

4.3	Chemikalien	30
4.4	Lösungen	32
4.5	Enzyme	35
4.6	Biochemikalien	35
4.7	Zellbiologische Materialien und Methoden	36
4.7.1	Verwendete Zelllinien	36
4.7.2	Kultivieren von V79MZ-Zellen	36
4.7.3	Ablösen von V79MZ-Zellen mittels Trypsin/EDTA	36
4.7.4	Passagieren von V79MZ-Zellen	37
4.7.5	Einfrieren von V79MZ-Zellen	37
4.7.6	Auftauen von V79MZ-Zellen	37
4.7.7	Herstellen von Zellhomogenat	37
4.8	Toxikologische Methoden	38
4.8.1	Cytotoxizität	38
4.8.1.1	MTT Assay	38
4.8.2	Genotoxizität	38
4.8.2.1	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-(HPRT)-Test zur Erfassung der Mutagenität	38
4.8.2.2	Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet Assay) zur Erfassung genotoxischer Effekte	39
4.8.2.2.1	Inkubation der Zellen	39
4.8.2.2.2	Herstellen der Präparate	40
4.8.2.2.3	Alkalidenaturierung und Elektrophorese	40
4.8.2.2.4	Neutralisierung und Anfärbung der DNA	41
4.8.2.2.5	Mikroskopie und Auswertung	41
4.8.2.3	³² P-Postlabeling Verfahren zum Nachweis von DNA-Addukten	41
4.8.2.3.1	Ernte der Zellen	41
4.8.2.3.2	Isolierung von DNA aus V79-Zellen	42
4.8.2.3.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	42
4.8.2.3.4	DNA-Hydrolyse	43
4.8.2.3.5	DNA-Addukt Anreicherung: Butanol-Extraktion	43
4.8.2.3.6	³² P-Postlabeling	43
4.8.2.3.7	Chromatographie	43
4.8.2.3.8	Kontrolle der Hydrolyse	45
4.8.2.3.9	Quantifizierung der Chromatogramme	45
4.9	Statistik	46
5	ERGEBNISSE	47
5.1	Charakterisierung der Einzelsubstanzen	47
5.1.1	4-Aminobiphenyl	47
5.1.1.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	47
5.1.1.2	Comet Assay (Genotoxizität)	48
5.1.1.3	HPRT Assay (Mutagenität)	51
5.1.2	<i>o</i> -Toluidin	52
5.1.2.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	52
5.1.2.2	Comet Assay (Genotoxizität)	53
5.1.2.3	HPRT Assay (Mutagenität)	55
5.1.3	<i>m</i> -Toluidin	56
5.1.3.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	56
5.1.3.2	Genotoxizität (Comet Assay)	57
5.1.4	Pyren	58
5.1.4.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	58
5.1.4.2	Genotoxizität (Comet Assay)	59
5.1.5	Benzo[<i>a</i>]pyren	59
5.1.5.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	59
5.1.5.2	Genotoxizität (Comet Assay)	61

5.1.6	Dibenzo[a,l]pyren	61
5.1.6.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	61
5.1.6.2	Genotoxizität (Comet Assay)	62
5.1.6.3	Mutagenität (HPRT Assay)	63
5.2	Wechselwirkungen	64
5.2.1	4-Aminobiphenyl mit 100fach höheren Konzentrationen von <i>m</i> -Toluidin	64
5.2.1.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	64
5.2.2	<i>o</i> -Toluidin mit gleichen und 10fach höheren Konzentrationen von <i>m</i> -Toluidin	65
5.2.2.1	Genotoxizität (Comet Assay)	65
5.2.2.2	Mutagenität (HPRT-Assay)	66
5.2.3	Wechselwirkung von Dibenzo[a,l]pyren und Pyren	67
5.2.3.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	67
5.2.3.2	Genotoxizität (Comet Assay)	68
5.2.3.3	Mutagenität (HPRT-Assay)	69
5.2.4	Wechselwirkung von Dibenzo[a,l]pyren und 4-Aminobiphenyl bzw. <i>o</i> -Toluidin	69
5.2.4.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	69
5.2.4.2	Genotoxizität (Comet Assay)	70
5.2.4.3	Mutagenität (HPRT-Assay)	73
5.2.5	Wechselwirkung von Pyren in 100- und 1000fach höheren Konzentrationen mit 4-Aminobiphenyl	74
5.2.5.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	74
5.2.5.2	Mutagenität (HPRT-Assay)	75
5.3	Bestimmung von DNA-Addukten mit ³²P-Postlabeling	75
5.3.1	DNA-Addukte von aromatischen Aminen	75
5.3.2	DNA-Addukte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen	78
5.4	MNNG als Positivkontrolle	79
5.4.1	Cytotoxizität (MTT Assay)	80
5.4.2	Genotoxizität (Comet Assay)	80
5.4.3	Mutagenität (HPRT Assay)	81
6	DISKUSSION	82
6.1	Diskussion der Methodik	82
6.1.1	V79 Zellbatterie	82
6.1.2	Comet Assay	84
6.2	Diskussion der Testsubstanzen	85
6.2.1	Aromatische Amine	86
6.2.2	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	88
6.2.3	Kombinationswirkungen	89
6.2.4	Bestimmung von DNA-Addukten durch ³² P-Postlabeling	92
6.3	Bewertung des toxikologischen Risikopotenzials von Stoffgemischen in gentechnisch modifizierten V79 Zellen	92
7	ZUSAMMENFASSUNG	94
8	LITERATURVERZEICHNIS	96

Abkürzungen

µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µL	Mikroliter (10^{-6} L)
µm	Mikrometer (10^{-6} m)
µM	mikromolar (10^{-6} mol/L)
2-AF	2-Aminofluoren
4-ABP	4-Aminobiphenyl
Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
aqua dest.	Destilliertes Wasser oder Reinstwasser
AS	Aminosäure
B[a]P	Benzo[a]pyren
bp	Basenpaar(e)
CYP	Cytochrom P450
CYPOR	NADPH-abhängige Cytochrom P450-Oxidoreduktase
Cyt b ₅	Cytochrom b ₅
DB[a,l]P	Dibenzo[a,l]pyren
DC	Dünnschichtchromatographie
DMBA	Dimethylbenz[a]anthrazen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DRZ	Diagonale radioaktive Zone
EC ₅₀	Konzentration, bei der die Zellvitalität auf 50% reduziert wird
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidium Bromid
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)

G418	Geneticin 418-Sulfat
Hb	Hämoglobin
hCYP	humanes Cytochrom P450
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LD ₅₀	Dosis, bei welcher 50% der Versuchstiere überleben
Lsg.	Lösung
min	Minute(n)
mL	Milliliter
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (= <i>messenger ribonucleic acid</i>)
<i>m</i> -Tol	<i>m</i> -Toluidin
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid)
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
n.a.	nicht analysiert
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH + H ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
NAT	N-Acetyltransferase
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte

OTM	<i>Olive Tail Moment</i>
<i>o</i> -Tol	<i>o</i> -Toluidin
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg ⁺⁺ und Ca ⁺⁺ (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pen.	Penicillin
PE-Platten	<i>plating efficiency</i> Platten
rpm	Umdrehungen pro Minute (= <i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S.E.	Standard Error = Standardabweichung vom Mittelwert
S9	metabolisch aktivierendes Enzymsystem
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
S-N-K	Student Newman Keuls Test
Std.	Stunde(n)
Strep.	Streptomycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit(en) (= <i>unit(s)</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
V79MZ1A1-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten, welche humanes Cytochrom P450 1A1 exprimieren
V79MZ1A2/NAT2*4-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten, welche humanes Cytochrom P450 1A2 und humane N-Acetyltransferase (Wildtyp) exprimieren
V79MZ1A2-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten, welche humanes Cytochrom P450 1A2 exprimieren
V79MZ1B1-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten, welche humanes Cytochrom P450 1B1 exprimieren
V79MZNAT2*4-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten, welche humane N-Acetyltransferase (Wildtyp) exprimieren
V79P-Zellen	V79 Chinesische Hamsterfibroblasten (Mainzer Subklon)

1 Einleitung

In modernen Industrienationen ist Krebs nach Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache. Im Jahr 2000 erkrankten in Deutschland rund 358.700 Menschen erstmals an Krebs. Nach Prostatakrebs war die zweithäufigste Tumorart bei Männern mit 16% der Lungenkrebs, ganz überwiegend hervorgerufen durch das Rauchen. Bei Frauen ist der Brustkrebs am häufigsten; 25,6% aller Tumorpatientinnen, die 2000 zum ersten Mal in Behandlung kamen, hatten Brustkrebs; das Mammakarzinom ist damit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen (<http://www.krebsinformation.de>).

Pro Jahr sterben in Deutschland rund 210.000 Personen an bösartigen Neubildungen, dies ist rund ein Viertel aller Todesfälle [1,2]. Diese hohe Zahl der Todesfälle belegt, dass die Erkrankung an Krebs immer noch zu den dringlichsten Problemen der heutigen Medizin gehört.

Hauptverantwortlich für die Krebsentstehung ist die Exposition gegenüber Umwelteinflüssen. Dazu zählen physikalische Einflüsse wie UV- oder ionisierende Strahlung, biologische Einflüsse durch bestimmte Bakterien und Viren oder chemische Substanzen. Hauptrisikofaktoren sind Tabakkonsum (25 bis 30%), Ernährungsgewohnheiten (20 bis 42%), Alkoholkonsum (3%) und berufliche Expositionen (4 bis 8%) [1]. Diese auf den Schätzungen von Doll [3] beruhenden Daten wurden auch in einer aktuellen Übersichtsarbeit von Colditz et al. [4] weitgehend bestätigt.

Nach heutigem Wissensstand ist das Mehrstufen-Konzept der Entstehung von Krebserkrankungen anerkannt, bei dem die Schädigung des Erbguts eine zentrale Stellung einnimmt [2]. Eine besondere Bedeutung kommt chemischen Substanzen als genotoxischen Agenzien zu. So werden über 500 chemische Substanzen (20% aller chronisch-toxikologisch getesteten Substanzen) im Tierexperiment als krebsauslösend eingestuft [2].

Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der WHO in Lyon (<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/grlist.html>) hat von 836 bewerteten Verbindungen 74 Stoffe als nachgewiesenermaßen kanzerogen für den Menschen eingestuft (IARC Gruppe 1), 56 Substanzen gelten als wahrscheinliche Humankanzerogene (IARC Gruppe 2A) und 225 Substanzen gelten als möglicherweise kanzerogen für den Menschen (IARC Gruppe 2B). Die größte Anzahl von 497 Substanzen (IARC Gruppe 3) ist hinsichtlich ihrer Kanzerogenität für den Menschen nicht klassifizierbar. Für viele Substanzen dieser Gruppe konnten auch im Tierversuch keine kanzerogenen Eigenschaften nachgewiesen werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Chemische Kanzerogenese

Der Arzt und Naturforscher Paracelsus beschrieb um 1500 vermutlich erstmals den Zusammenhang zwischen einer chemischen Substanz und Krebs, in dem er eine Verbindung zwischen dem Lungenkrebs von Bergleuten und Rauschrot (As_4S_4 oder Realgar) vermutete [2]. Percival Pott beschrieb 1775 den Ruß als Ursache für den Hautkrebs an Scrotum und Oberschenkeln der Londoner Schornsteinfeger und war damit der erste, der eine Belastung mit chemischen Substanzen als Krebsursache einer bestimmten Berufsgruppe zuordnete [5]. Der Beginn der experimentellen Krebsforschung Anfang des 20. Jahrhunderts brachte die Bestätigung der Beobachtung Potts, indem der japanische Pathologe Yamagiwa erstmals einen chemisch induzierten Krebs (Teerkrebs der Haut) im Tierexperiment erzeugen konnte [6].

Heute werden chemische Kanzerogene entsprechend ihres Wirkmechanismus in zwei Kategorien unterteilt [2]: Die Gruppe der „genotoxischen Kanzerogene“ umfasst DNA-reaktive Substanzen, die mit der Erbsubstanz interagieren und dadurch mutagen wirken [7]. Hierbei kann man zwischen direkten Kanzerogenen, die ohne metabolische Aktivierung wie zum Beispiel Nitrosamide, oder indirekten Kanzerogenen, deren krebsauslösende Aktivität einer metabolischen Aktivierung bedarf [8], unterscheiden. Zu dieser letztgenannten Klasse gehören zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) [9] und aromatische Amine (AA) [10,11]. Die zweite Kategorie chemischer Kanzerogene umfasst nicht-genotoxische, „epigenetische Kanzerogene“ wie zum Beispiel Asbest, DDT, Östradiol oder Butylhydroxyanisol, deren Wirkung vermutlich cytotoxischer, tumorpromovierender oder pseudohormoneller Natur ist. In letzter Folge beruht die krebsauslösende Wirkung dieser epigenetischen Kanzerogene auf einer gesteigerten Mutationsrate, oxidativer Schädigung der DNA, Veränderung der Genexpression oder Erhöhung der Proliferationsrate [12-14].

2.1.1 Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene

Wie unter Abschnitt 2.1 beschrieben, werden chemische Kanzerogene in zwei Gruppen unterteilt. Der weitaus größere Teil dieser krebsauslösenden Noxen gehört zu den genotoxischen Kanzerogenen, die entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung mit zellulären Makromolekülen, insbesondere der DNA, interagieren und dadurch mutagen wirken.

Verantwortlich für die metabolische Aktivierung sind vor allem Enzyme, die Biotransformationen von xenobiotischen Stoffen katalysieren. Dabei werden kanzerogene Chemikalien als

„Prokanzerogene“ durch metabolische Aktivierung in „proximale“ und letztendlich in „ultimale“ Kanzerogene umgewandelt. Diese so aktivierten elektrophilen Spezies reagieren mit nukleophilen Zentren wie DNA-Basen oder Proteinen, häufig unter Bildung kovalenter Bindungen.

2.2 Das Phasen-Konzept des Fremdstoffmetabolismus

Die Verstoffwechslung von lipophilen Fremdstoffen kann formal in zwei Phasen eingeteilt werden [15]: Der Phase-I-Metabolismus (Funktionalisierung) führt unpolare, lipophile Stoffe in polare, hydrophilere Stoffe über, indem funktionelle Gruppen eingeführt oder demaskiert werden. Diese Aufgaben übernehmen Oxidoreduktasen oder Hydrolasen über die Einführung oder Freisetzung nukleophiler oder elektrophiler Ankergruppen. Wichtigster Vertreter dieses Metabolismus-Systems ist die Cytochrom P450-Familie, deren Enzyme stereo- und regio-selektiv den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Fremdstoffmolekül katalysieren [16].

Enzyme des Phase-II-Metabolismus (Konjugation) konjugieren Fremdstoffe oder Phase-I-Metaboliten an hoch hydrophile, endogene Moleküle durch Glutathionkonjugation, Glucuronidierung, Acetylierung oder Sulfatierung. Aus der Konjugation entsteht in aller Regel ein vollständig detoxifizierter Metabolit, der nach Modifikation ausreichend hydrophil ist um renal oder biliär ausgeschieden werden zu können.

Allerdings können auch Konjugate des Phase-II-Metabolismus aktivierte Spezies darstellen und als Elektrophile DNA-Addukte bilden. Die Konjugation mit hydrophilen Komponenten wird durch cytosolische und membranständige Transferaseenzyme katalysiert.

2.2.1 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)

Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine Superfamilie von Hämoproteinen, die eine Schlüsselrolle im oxidativen Stoffwechsel zahlreicher endogener und exogener Substanzen spielt. Die Bezeichnung der gesamten Enzymgruppe erfolgte aufgrund der charakteristischen UV-Absorption bei 450 nm Wellenlänge nach Bindung von Kohlenmonoxid an die als prosthetische Gruppe in das Enzymmolekül eingelagerte Hämgruppe.

Die von den Enzymen dieser Familie vermittelte Oxidation erhöht die Polarität vieler Fremdstoffe und beschleunigt somit deren Eliminierung aus dem Körper. Auf der anderen Seite können jedoch die Cytochrom-P450-Enzyme zur Giftung bestimmter Substrate beitragen und/oder eventuelle Kanzerogenität hervorrufen bzw. erhöhen.

Es sind inzwischen insgesamt über 300 Gene bekannt, die für Vertreter der Cytochrom-P450-Enzymfamilie kodieren [17,18]. Innerhalb der Superfamilie richtet sich die Einteilung in Familien, Subfamilien und Einzelenzyme nach den Sequenzhomologien der Proteine. Bezogen auf die Sequenzidentität der Proteine gehören alle Enzyme mit mehr als 40% Homologie derselben Familie an und werden mit einer Zahl gekennzeichnet (Abb. 1). Mehr als 55% Übereinstimmung hat die Klassifizierung in die gleiche durch Buchstaben bezeichnete Subfamilie zur Folge. Die darauf folgende Zahl bezeichnet das Gen, welches für das spezielle Isoenzym kodiert, die anschließend mit Stern angefügten Zahlen und Buchstaben charakterisieren Modifikationen des Isoenzym innerhalb eines oder beider Allele. Sie kommen z.B. durch Mutationen zustande, die oft nur den Austausch eines Nukleotids in der Basensequenz bewirken, den sogenannten *single nucleotide polymorphism*.

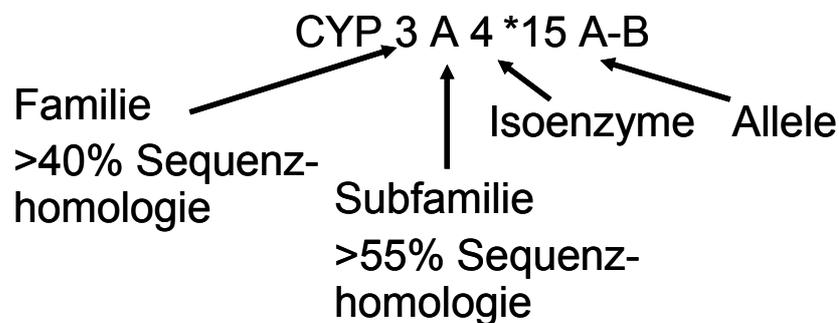


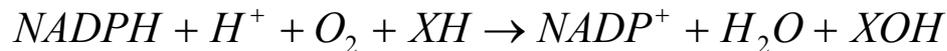
Abb. 1: Klassifizierung der Cytochrome P450

Cytochrome P450 kommen bei Säugetieren in den meisten Geweben vor, besonders aber in der Leber [19]. Dort sind die Enzyme in den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums (und in geringerem Umfang auch in den Mitochondrien) verankert [20].

Das Hämoprotein Cytochrom P450 katalysiert die Biotransformation von mehr als 200.000 Chemikalien [16,21]. Cytochrome P450 monooxygenieren Substrate in einem NADPH-abhängigen Reaktionszyklus zu Alkoholen, Epoxiden sowie *O*- und *N*-Dealkylierungsprodukten. Dabei bilden Cytochrome P450 einen Multienzymkomplex mit der NADPH-abhängigen P450-Oxidoreduktase (CYPOR) und Cytochrom b_5 , die den Elektronentransfer von NADPH auf das Cytochrom P450 katalysieren [22].

Alle CYP fügen als Monooxygenasen jeweils ein einzelnes Sauerstoffatom in ein Substratmolekül ein. Das bei der Spaltung von molekularem Sauerstoff frei werdende zweite Sauer-

stoffatom reagiert zu Wasser weiter. Die allgemeine Reaktionsgleichung der durch CYP katalysierten Redoxreaktion an einem Substrat X lautet:



Diese Reaktion ist an einer Vielzahl von endogenen (Fettsäuren, Steroide) und exogenen Substraten möglich, wobei sich die Substratspezifität der einzelnen Enzyme z.T. stark überlappt. Durch den Transfer eines Elektrons von der assoziierten NADPH-abhängigen Cytochrom-P450-Reduktase wird das Eisen von Fe^{3+} auf Fe^{2+} reduziert, so dass es dann molekularen Sauerstoff binden kann. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons von der Cytochrom-P450-Reduktase oder durch lösliches Cytochrom b_5 wird dieser Komplex weiter aktiviert. Es resultiert ein hochreaktive Komplex, der im weiteren Verlauf die Substratoxidation bewirkt.

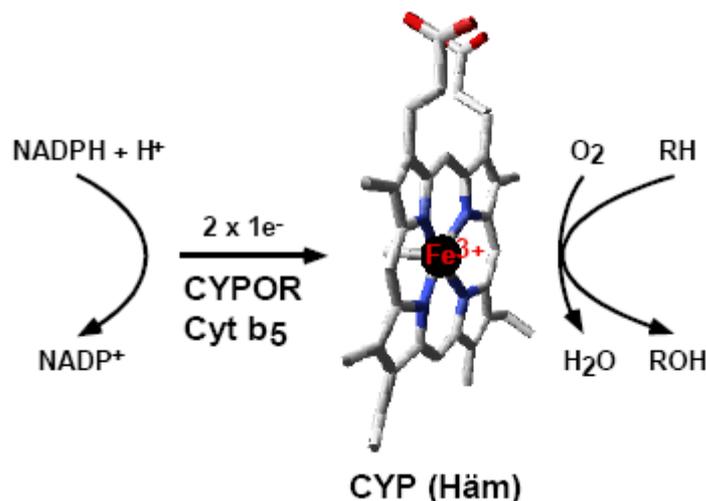


Abb. 2: Schema zur Monoxygenierung eines Substrates durch Cytochrom P450. Das Substrat RH wird im aktiven Zentrum des CYP gebunden. Anschließend wird durch die CYPOR ein Elektron auf das zentrale Fe^{3+} der Häm-Gruppe übertragen. Der nun zweiwertige Häm-Eisen-Komplex kann molekularen Sauerstoff als sechsten Liganden binden. Durch Übertragung des Elektrons auf den Sauerstoff entsteht ein Fe^{3+} -Komplex mit einem Superoxidanion. Nach Übernahme eines zweiten Elektrons, das statt von der CYPOR auch von Cytochrom b_5 übertragen werden kann, disproportioniert der Sauerstoff zu H_2O und aktiviertem Sauerstoff. In einer homolytischen Reaktion wird das aktivierte Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das oxidierte Produkt ROH verlässt die Bindungsstelle des Enzyms [23].

Die Cytochrom-P450-Enzyme der CYP1-Familie, welche die zwei Subfamilien CYP1A und CYP1B beinhaltet, sind induzierbare Enzyme, deren Expression über den cytosolischen Rezeptor für aromatische Kohlenwasserstoffe (Ah-Rezeptor Signalweg) reguliert wird [24]. Der Ah-Rezeptor, ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, vermittelt toxische Wirkungen. Als Induktoren fungieren unter anderem die planaren polyzyklischen aromatischen

Kohlenwasserstoffe, z.B. 3-Methylcholanthren, Benz[a]anthracen und Benzo[a]pyren. Wie Shimizu et al. [25] zeigten, hat Benzo[a]pyren bei Langzeitapplikation auf die Haut von Mäusen kanzerogene Wirkung, nicht jedoch bei Tieren ohne Ah-Rezeptor (Ah -/-). Durch Bindung der Liganden an den Rezeptor wird eine Batterie von Genen aktiviert, darunter jene der Cytochrom P450-Formen CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Die Enzyminduktion tritt bereits nach einmaliger, jedoch wesentlich stärker nach längerfristiger Aufnahme der Fremdstoffe auf. Bei Rauchern wurden signifikant höhere Mengen an CYP1A1 und CYP1B1 mRNA detektiert als bei Nichtrauchern [26].

2.2.1.1 *Cytochrom P450 1A1*

Beim Menschen konnten erhöhte CYP1A1 Aktivitäten in Lungenbiopsien von Rauchern und in primären Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden [27]. Außerdem wurden für den Menschen phäno- und genotypische Polymorphismen des CYP1A1 mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Zusammenhang gebracht [28]. Gesichert ist die Rolle des CYP1A1 bei der Giftung polyzyklischer Aromaten, wie des Benzo[a]pyrens, durch Überführung in kanzerogene Epoxide. CYP1A1 ist kein konstitutives Enzym und wird nach Induktion vorwiegend in extrahepatischen Geweben exprimiert, in vereinzelten Fällen auch in der Leber [29]. Es wird durch polyzyklische Aromaten und Zigarettenrauch über Ah-Rezeptor-vermittelte Reaktionen induziert. Der stärkste bekannte Induktor ist das Sevesogift 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]-dioxin (TCDD). Im Wesentlichen katalysiert CYP1A1 die Epoxidierung von PAK. CYP1A1 verstoffwechselt neben PAK auch Arzneimittel wie Theophyllin, Warfarin, Amiodaron, Propranolol und Paracetamol, die auch Substrate des CYP1A2 sind [30].

2.2.1.2 *Cytochrom P450 1B1*

CYP1B1 wird außer in der Leber auch noch in verschiedenen anderen Organen exprimiert. Die Cytochrom P450 1B1 (CYP1B1) mRNA wurde in Lymphozyten, Lunge, Uterus und Leber detektiert [31,32]. Der Expressionsstatus von CYP1B1 in adulten Lebern ist generell sehr niedrig. Bei Föten wurde es lediglich in drei von sechs Lebern exprimiert [33]. Es zeigt eine erhöhte Expression in vielen humanen Tumoren und scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression von Tumoren zu spielen. Es kann als potenzielles Target von chemopräventiven Stoffen gegen Krebs eine Rolle spielen, indem diese die Aktivität von CYP1B1 hemmen. Andererseits dient es als möglicher Biomarker für Tumoren [34]. Das Enzym kann polyzyklische Aromaten zu genotoxischen Produkten metabolisieren [35]. Außer-

dem ist es wie alle Vertreter der CYP1-Familie am Stoffwechsel von Koffein und Theophyllin beteiligt [36].

2.2.1.3 *Cytochrom P450 1A2*

Cytochrom P450 1A2 ist ein konstitutives Enzym, welches einen wesentlichen Anteil der hepatisch exprimierten Cytochrom P450 Enzyme ausmacht. In extrahepatischen Geweben wird praktisch keine Expression dieses Cytochroms beobachtet. Zusammen mit dem zu 72% homologen Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) bildet das P450 1A2 (CYP1A2) die Cytochrom P450 1A-Subfamilie [37]. Neben einer Reihe von Arzneistoffen [38] werden auch verschiedene aromatische Amine und heterozyklische Arylamine metabolisiert, welche während der Zubereitung von Fleisch entstehen und eine ausgeprägte mutagene Wirkung zeigen [39]. Einige der Substrate weisen nach ihrer metabolischen Aktivierung durch CYP1A2 ein kanzerogenes Potenzial auf, indem sie labile, elektrophil reagierende Zwischenprodukte bilden; dabei entstehen N-Hydroxyl-Arylamine, Phenole, Epoxide und Carbinole, wobei letztere oft instabil sind und zur Dealkylierung neigen [35,40-42]. Fundierte Erkenntnisse bezüglich der kanzerogenen Wirkung aromatischer Amine resultieren aus einer großen Anzahl tierexperimenteller Studien und Untersuchungen am Menschen [43]. Aromatische Amine, wie zum Beispiel 4-Aminobiphenyl (4-ABP), 2-Naphthylamin (2-NA) und *o*-Toluidin wurden sowohl in Zigarettenrauch als auch in Folgeprodukten von Kohle und Öl nachgewiesen [44]. So können bei Rauchern beispielsweise 4-ABP oder andere aromatische Amine über die durch CYP1A2 katalysierte N-Hydroxylierung aktiviert werden. Die so modifizierten Stoffe werden daraufhin über den Blutkreislauf der renalen Filtration zugeführt, gelangen in das Lumen der Blase, wo sich im Zuge der Reabsorption durch das Blasenepithel Arylamin-DNA-Addukte bilden können [45,46].

Aufgrund der CYP1A2-spezifischen N₃-Demethylierung am Koffein, wird dieses seit einiger Zeit als Markersubstrat zu Phänotypisierungszwecken verwendet [38]. Interessanterweise inhibiert Grapefruitsaft über seinen Hauptbestandteil Naringenin die CYP1A2-Aktivität [47].

2.2.2 **N-Acetyltransferasen**

N-Acetyltransferasen sind ausschließlich cytosolisch verteilte fremdstoffmetabolisierende Phase-II-Enzyme. Die N-Acetyltransferasen 1 und 2 (NAT1 und NAT2) katalysieren die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-Coenzym A auf Amine und Hydroxylamine [48].

Die Aktivität von hNAT1 ist in vielen Geweben sowohl in juvenilen [49] als auch in adulten Entwicklungsstadien [50,51] nachweisbar. Im Gegensatz dazu werden NAT2-Aktivitäten lediglich in Leber und Darm gefunden [52]. Beide NAT katalysieren N-Acetylierungen, O-Acetylierungen und N,O-Acetyltransfer von Xenobiotika und Kanzerogenen, unterscheiden sich aber trotz ihrer 80%igen Aminosäuresequenzidentität signifikant in ihrer Substratspezifität. Als Leitsubstrat der NAT1 gilt die p-Aminosalicylsäure, die NAT2 katalysiert unter anderem die Acetylierung von Isoniazid [53-56]. Neben der N-Acetylierung von aromatischen Aminen katalysieren die NAT auch die O-Acetylierung von N-Hydroxyarylaminen. Im Falle der potenziell kanzerogenen Stoffe N-Hydroxy-2-aminofluoren und N-Hydroxy-4-aminobiphenyl führt die O-Acetylierung zu instabilen Produkten, welche zu DNA- oder Proteinreaktiven Nitrenium-Ionen zerfallen [46,57,58].

NAT1 wird vorwiegend extrahepatisch exprimiert, ein wichtiges Organ ist die Blase. NAT2 ist im Cytosol der Leber und des Dünndarmepithels lokalisiert. Für NAT2 existiert ein wichtiger Polymorphismus, der bereits vor annähernd 50 Jahren beschrieben wurde. Phänotypisch erfolgte aufgrund interindividueller Unterschiede in Nebenwirkungsrate und Metabolismus des Tuberkulostatikums Isoniazids eine Einteilung der Patienten in schnelle und langsame Acetylierer. Somit waren die NAT die ersten Enzyme, für welche ein kausaler Zusammenhang bezüglich interindividueller Schwankungen beim Metabolismus von Arzneimitteln hergestellt werden konnte [54,59].

Bei Belastung des Organismus mit Arylaminen wird die Regioselektivität des Kanzerogens durch den Acetyliererstatus beeinflusst: schnelle Acetylierer entwickeln unter diesen Bedingungen seltener Blasenkrebs, dafür aber häufiger Darmkrebs als langsame Acetylierer. Eine Erklärung dafür wäre, dass schnelle Acetylierer mit größerer Effizienz bereits acetylieren, bevor eine Aktivierung, also N-Hydroxylierung durch CYP stattfinden kann (Abb. 3). Die NAT2-Aktivität bzw. der Acetyliererstatus kann wie die Aktivität von CYP1A2 anhand von Koffeinmetaboliten im Urin festgestellt werden [38,60]: Dabei wird der Quotient der Metabolitenkonzentrationen des 5-Acetylamino-6-amino-3-methyluracils (AAMU) und des 1-Methylxanthins (1X) bestimmt, wobei ein Verhältnis AAMU/1X von größer als 2 den schnellen Acetylierer charakterisiert.

In Japan sind mehr als 90% der Population schnelle Acetylierer, in Mitteleuropa sind es nur etwa 40% der Bevölkerung und in mediterranen Ländern fällt dieser Prozentsatz auf bis zu 10% ab [18].

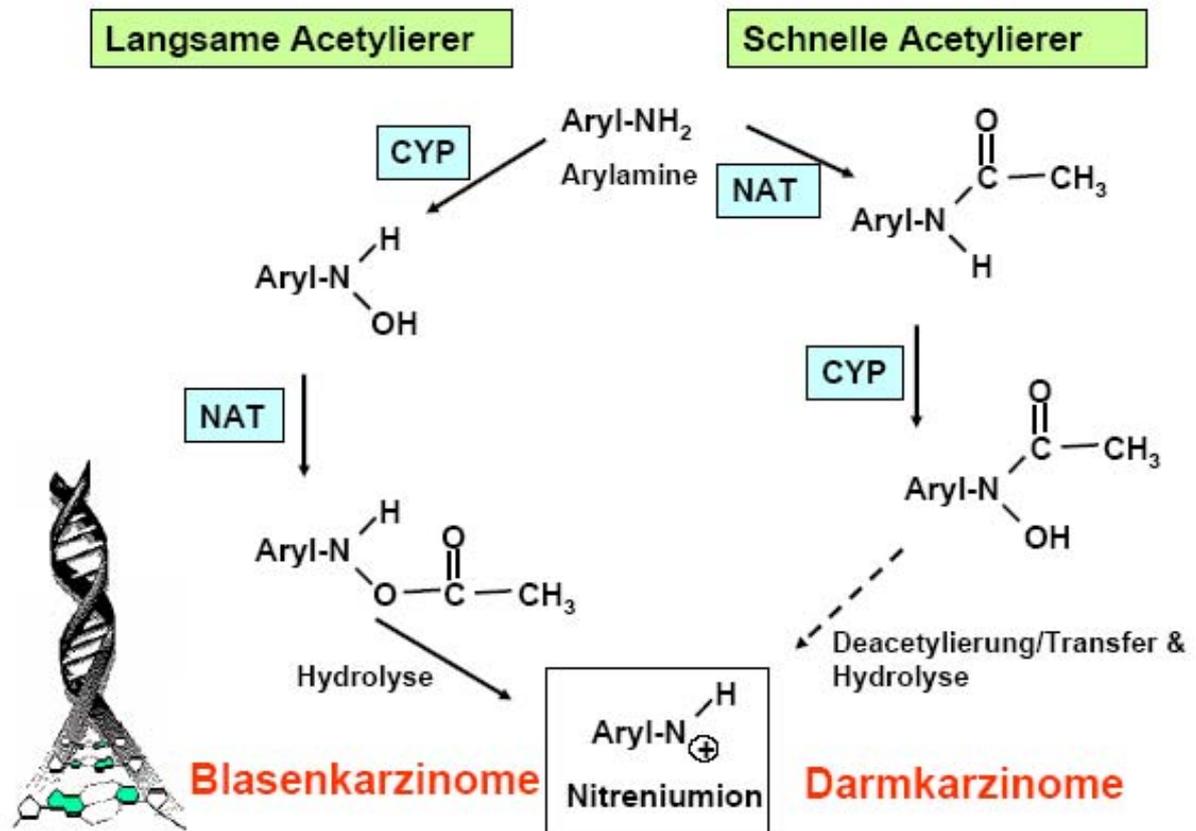


Abb. 3: Acetyliererstatus und Krebsentstehung (<http://www.iuf.uni-duesseldorf.de/Vorlesung/fremdstoff>)

Die toxikologische und arbeitsmedizinische Relevanz des NAT2-Polymorphismus wird durch Ergebnisse von Studien mit Blasenkrebspatienten hervorgehoben. Unter den Blasenkrebsfällen waren die langsamen Acetylierer deutlich in der Überzahl: bei Betrachtung einer Untergruppe von Chemikararbeitern aus der Farbstoffindustrie waren 22 von 23 untersuchten Blasenkrebspatienten langsame Acetylierer [61]. Dieser Befund einer Häufung von langsamen Acetylierern ist auch in einem größeren Kollektiv von Beschäftigten in der chemischen Industrie bestätigt worden [62].

Als gesichert kann auch die Assoziation zwischen Blasenkrebs, Zigarettenkonsum und langsamem Acetyliererstatus angesehen werden. Eine Zusammenfassung von sechs Studien aus verschiedenen europäischen Ländern bestätigt an Hand von 1530 Fällen und 731 Kontrollen ein erhöhtes Risiko der Erkrankung an Blasenkrebs für Raucher mit langsamem Acetyliererstatus [63].

2.3 Exogene Kanzerogene

2.3.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

2.3.1.1 Vorkommen

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind mit dem Fortschreiten der Industrialisierung und Motorisierung zu einer ubiquitär anzutreffenden Umweltkontamination geworden. Sie entstehen bei unvollständigen Verbrennungen von organischem Material wie Holz, Kohle und Mineralöl, insbesondere unter Sauerstoffmangel. Sie sind beispielsweise in Teer, Ruß, Petroleum, Ölen, Autoabgasen und Tabakrauch enthalten [64]. In städtischen Ballungsräumen sind der motorisierte Straßenverkehr und das Heizen mit fossilen Brennstoffen wesentliche Quellen in der Außenluft. Weitere wichtige Belastungsquellen in der Innenraumluft sind das Rauchen und der Verzehr von gebratenen, gegrillten und geräucherten Lebensmitteln [64]. Über die Luft werden die PAK gebunden an Partikel wie Staub, Ruß und Pollen verbreitet.

2.3.1.2 Aufnahme und Verteilung

Eine Analyse der täglichen Exposition des Menschen ergab, dass die inhalative und die orale PAK-Aufnahme sich in der gleichen Größenordnung (wenige ng bis 1 µg pro Tag) bewegen. Die PAK werden als lipophile Verbindungen über die Lungenalveolen resorbiert. Dorthin können Partikel mit einem Durchmesser von <5 µm gelangen. Größere Partikel lagern sich bereits in den oberen und mittleren Atemwegen ab. Durch die mukoziliäre Clearance und das Abschlucken von Partikeln mit dem Tracheobronchialsekret gelangen PAK aber auch nach Inhalation teilweise in den Gastrointestinaltrakt. Dort werden, wie Tierversuche ergaben, nur etwa 10% der aufgenommenen PAK resorbiert [64]. Nach ca. einer Stunde erscheinen kleine Anteile der aufgenommenen Dosis in Gallenflüssigkeit, Urin und Lymphe, während der Hauptanteil sich auch nach 24 Stunden noch in den intestinalen Ingesta befindet. In die Gallenflüssigkeit gelangte, metabolisch konjugierte PAK werden nach Spaltung im Darmlumen z.T. erneut resorbiert, unterliegen also einem enterohepatischer Kreislauf. Fettgewebe, Nebennieren, Ovarien und Leber stellen die wichtigsten Depotkompartimente für PAK dar, ihr Nachweis ist in diesen Geweben noch nach Monaten möglich. Eine einmalige Aufnahme einer großen Menge an PAK führt vermutlich durch Hemmung der DNA-Synthese zu Schädigungen von mitoseaktiven Geweben (intestinales Epithel, Gonaden, Hämatopoese) sowie der Nebennierenrinde.

2.3.1.3 Biotransformation

Das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel polyzyklischer Kohlenwasserstoffe zu reaktiven Epoxiden, die wiederum durch Epoxidhydrolasen in Diole überführt werden.

Die enzymatischen Reaktionen der Phase I bewirken bei PAK eine gesteigerte Reaktivität gegenüber zellulären Makromolekülen einschließlich der DNA, sind andererseits aber Voraussetzung für die Reaktionen der Phase II, welche die Hydrophilie des Moleküls entscheidend erhöhen und damit dessen Exkretion durch aktiven Transport über die Nieren, die Gallenflüssigkeit und – wie kürzlich für den kanzerogenen PAK Benzo[a]pyren gezeigt werden konnte – das Darmepithel ermöglichen [65]. Durch Glutathion-S-Transferasen, Sulfo- und Glucuronosyltransferasen werden diese Epoxide entweder mit Glutathion konjugiert oder in phenolische Metaboliten mit Sulfat- bzw. Glucuronidresten transformiert. Diese Phase II-Prozesse ermöglichen die Elimination nukleophiler und elektrophiler Umwandlungsprodukte.

Toxikologisch von besonderer Bedeutung ist die Epoxidierung. Epoxide werden aus polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch CYP1A1 und CYP1B1 gebildet. Auf Grund ihrer Elektrophilie können Epoxide, zum Beispiel aus Benzo[a]pyren oder Aflatoxin B1, Mutationen auslösen, die zur Kanzerogenese führen können. Während das aus Benzo[a]pyren zunächst gebildete Epoxid sehr schnell wieder von einer Epoxidhydrolase (EH) entschärft wird, ist das im zweiten Oxidationsschritt gebildete Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid nur ein schlechtes Substrat für die Hydrolase, so dass eine weitere Reaktion mit der DNA erfolgen kann [66]. Eine Inaktivierung der aus Phase I resultierenden Metaboliten erfolgt, wie bereits erwähnt, durch die Epoxidhydrolase, die Epoxide in weniger reaktive vizinale Diole umwandelt. Epoxidhydrolasen sind den CYP Enzymen in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums räumlich eng benachbart, werden aber in ihrer Expression getrennt reguliert [67]. Sie katalysieren die Reaktion von Wasser mit Epoxiden zu trans-Dihydrodiolen [68]. Ihr Vorkommen ist in zahlreichen Geweben beschrieben, darunter im Dünndarm. Ihre höchsten Konzentrationen finden sich in der Leber [69].

2.3.1.4 Toxizität

Als ersten Hinweis auf die Kanzerogenität dieser Substanzklasse kann die von Percival Pott 1775 berichtete ungewöhnlich hohe Inzidenz an Skrotumkrebs bei Kaminkehrern gewertet werden [5]. 1892 wurde ebenfalls bei Schornsteinfegern sowie bei Arbeitern der Teer und Pech verarbeitenden Industrie das Auftreten von Krebs der Haut und inneren Organe

beschrieben. Zu den PAK, für die eine kanzerogene Wirkung nachgewiesen ist bzw. diese vermutet wird, zählen insbesondere die sieben PAK, die von der amerikanischen Umweltschutzbehörde (US-EPA) als mögliche Kanzerogene (Klasse B2) eingestuft wurden [70]. Auch das Ergebnis einer neueren Meta-Analyse von 39 Arbeitsplatzstudien zeigt, dass das Risiko für Lungenkrebs bei diesen Expositionen deutlich erhöht ist [71].

Vergleichenden Untersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere Dihydrodiol-Epoxide von PAK, welche wie Benzo[a]pyren (nicht jedoch Pyren) eine sogenannte „Bay-Region“ (Bucht zwischen vier C-Atomen bzw. drei Benzolringen) aufweisen, kanzerogene Eigenschaften besitzen [72]. Diese Metaboliten gehen u. a. kovalente Bindungen mit der freien Aminogruppe des Guanins von DNA und RNA ein [73]. Bei PAK mit einer Fjord-Region, z.B. Dibenz[a,l]pyren, führt die Bildung von Diolepoxiden an dieser Stelle zu Metaboliten mit noch stärkerer kanzerogener Aktivität, weil in dieser Region aus sterischen Gründen die Entgiftung durch Epoxidhydrolasen stärker behindert ist als in der Bay-Region [64].

2.3.1.5 *Verwendete polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe*

Es wurden zwei kanzerogene und eine nicht kanzerogene Substanz aus der Klasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in die Untersuchungen aufgenommen:

Benzo[a]pyren (IARC Gruppe 2A), Dibenz[a,l]pyren (IARC Gruppe 2B) und Pyren (IARC Gruppe 3).

2.3.1.5.1 *Benzo[a]pyren*

Die ubiquitär vorkommende Modellsubstanz Benzo[a]pyren (Summenformel: $C_{20}H_{12}$; MW: 252,32 g/mol) ist als solches nicht reaktiv und wird deshalb als Prokanzerogen bezeichnet. Erst die metabolische Aktivierung in Phase I führt zur Bildung hochreaktiver Epoxide, welche Reaktionen mit zellulären Makromolekülen (DNA, Proteine) eingehen können [73], wenn nicht weitere enzymatisch gesteuerte Transformationen an den gebildeten Epoxiden stattfinden. Dazu gehören z.B. die Hydrolyse zu Hydroxymetaboliten durch die Epoxidhydrolase oder die Konjugation mit endogenen Substraten in Phase II, wie Sulfat- und Glucuronsäureresten oder Glutathion [74].

In der Leber kann B[a]P durch CYP1A1 unter anderem zum BP-7,8-epoxid oxidiert werden, welches dann von der Epoxidhydrolase zum BP-7,8-dihydrodiol hydrolysiert werden kann. Anschließend kann es zur Umwandlung zum BP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, dem ultimalen kanzerogenen Metaboliten [75,76] durch weitere CYP-Isoformen kommen, wobei hier

besonders das CYP1B1 zu erwähnen ist [77] (Abb. 4). Die vier optisch aktiven 7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[*a*]pyren-7,8-diol-9,10-epoxide können als ultimale Kanzerogene die DNA unter Bildung von N²-, N⁷-Guanyl- oder N⁶-Adenyl-Addukten angreifen [3,7].

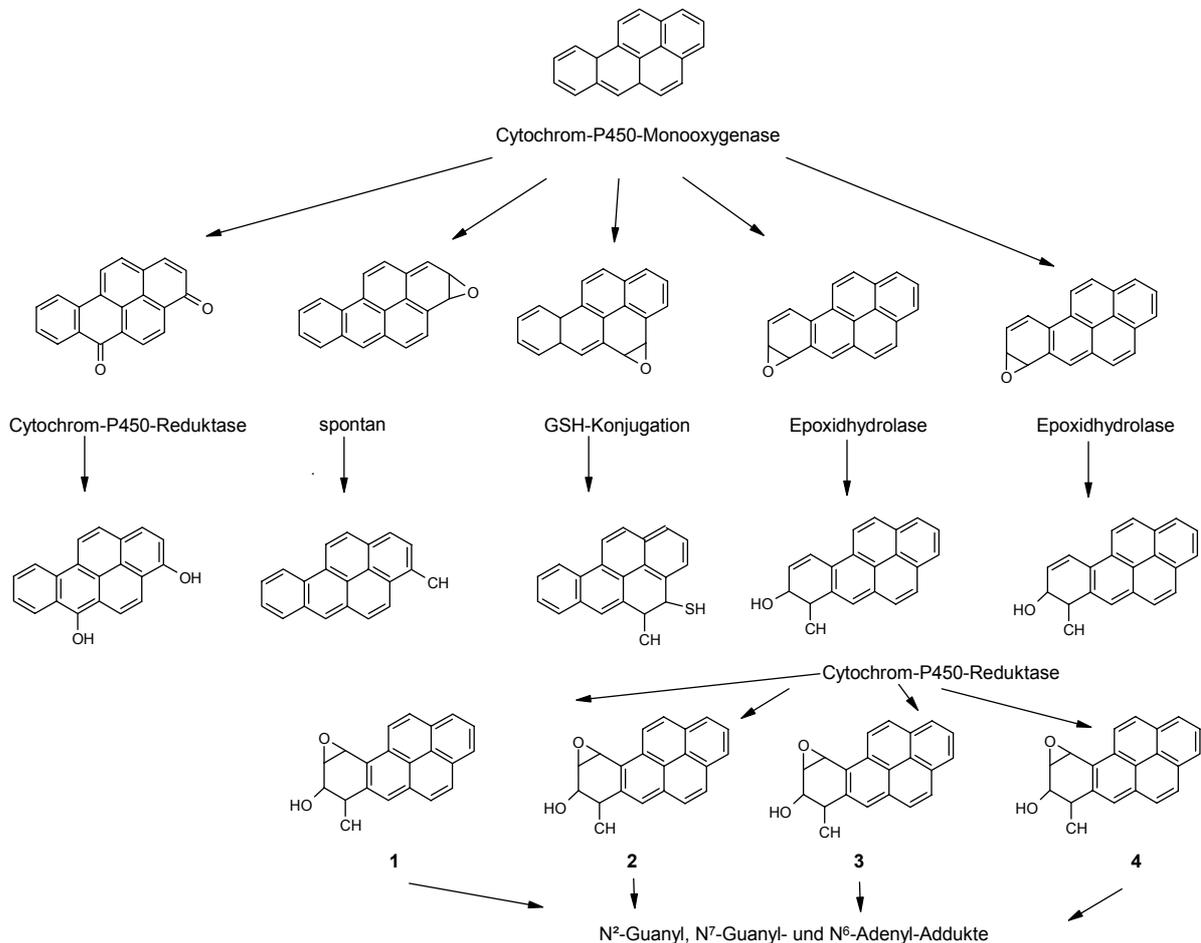
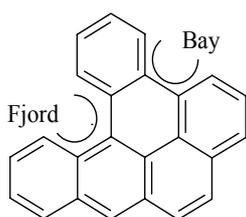


Abb. 4: Ausgewählte Stoffwechselforgänge der metabolischen Umwandlung von Benzo[*a*]pyren; GSH = Glutathion; 1 = (+)(7R,8S,9R,10S)-Dihydrodirolepoxid; 2 = (-)(7R,8S,9S,10R)-Dihydrodirolepoxid (potentestes Kanzerogen); 3 = (-) 7S,8R,9R,10S)-Dihydrodirolepoxid; 4 = (+)(7S,8R,9S,10R)-Dihydrodirolepoxid

2.3.1.5.2 Dibenzo[*a,l*]pyren

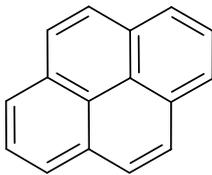


Seit den jüngsten Befunden zur Toxizität von PAK, die eine sogenannte Fjord-Region enthalten, wie z.B. Dibenzo[*a,l*]pyren, wird die Funktion des Benzo[*a*]pyrens als Leitsubstanz in PAK-Gemischen diskutiert.

Abb. 5: Dibenzo[*a,l*]pyren

Dibenzo[*a,l*]pyren (Summenformel: $C_{24}H_{14}$; MW: 302,37 g/mol) (Abb. 5) ist ein PAK mit einer sogenannten Fjord-Region-Struktur, das sich als 100fach toxischer erwies als das ultimale mutagene und kanzerogene Benzo[*a*]pyren-7,8-diol,9,10-epoxid [78,79]. Der Cytochrom P450 abhängige Metabolismus der Fjord-Region enthaltenden PAK und insbesondere ihrer Derivate wurde von der Arbeitsgruppe von Döhmer [78,79] für menschliche Cytochrom P450-Isoenzyme weitgehend aufgeklärt.

2.3.1.5.3 Pyren als Modellsubstanz



Pyren (Abb. 6) ist in Gemischen von PAK quantitativ sehr stark vertreten und wird aus diesem Grund neben Phenanthren als Leitsubstanz im Biomonitoring verwendet.

Abb. 6: Pyren

Pyren (Summenformel: $C_{16}H_{10}$, MW: 202,26 g/mol) wurde als Modellsubstanz ausgewählt, da es nach Struktur und Molekülgröße als typischer Vertreter der PAK gelten kann, aufgrund der fehlenden „Bay-Region“ jedoch nicht die kanzerogenen Eigenschaften hat, die manche PAK, vor allem Benzo[*a*]pyren, in den vergangenen Jahrzehnten in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt haben. Pyren zeigt, im Gegensatz zu Benzo[*a*]pyren, trotz großer Ähnlichkeit der Molekülgestalt keine Mutagenität im Ames-Test [80]. Eine fehlende Metabolisierung durch den Organismus ist jedoch nicht die Ursache für diesen Unterschied, denn bereits Untersuchungen aus den 50er Jahren belegen eine Metabolisierung von Pyren zu Pyren-1-Hydroxid und Pyren-1-Glucuronid in der Leber von Mäusen nach intravenöser Injektion [81].

2.3.2 Aromatische Amine

2.3.2.1 Vorkommen der untersuchten aromatischen Amine

Aromatische Amine sind aus der Arbeitsmedizin seit langem als krebserzeugend für den Menschen bekannt [44]. Die Exposition am Arbeitsplatz mit aromatischen Aminen erklärt in den westlichen Industrieländern etwa ein Viertel aller Blasen Tumore.

Bereits wenige Jahrzehnte nach Beginn der industriellen Produktion von Farben auf der Basis von Anilin wurden aromatische Amine mit der Entstehung von Harnblasenkrebs in Verbindung gebracht [44]. Im Jahre 1895 beschrieb Rehn drei Fälle von Blasenkrebs bei Arbeitern in

der Fuchsin-Farbstoffherstellung. Verantwortlich hierfür machte er das Anilin, obwohl auch weitere Amine wie *o*- und *p*-Toluidin in der Herstellung verwendet wurden. Für das gehäufte Auftreten von Blasenkrebs war aber in erster Linie die chronische Einwirkung von aromatischen Aminen, wie die bereits 1898 und 1906 als eindeutig kanzerogen für den Menschen erkannten Amine 2-Naphthylamin und Benzidin sowie das erst 1955 erkannte 4-Aminobiphenyl verantwortlich.

Arylamine werden auch heute noch für die Herstellung von Farben, Pharmazeutika, Harzen, Isocyanatstoffen, Kautschukchemikalien und Bioziden verwendet. Aromatische Amine sind in der Umwelt weit verbreitet. Hierzu tragen auch Autoabgase speziell von Dieselmotoren bei, die vor allem Nitroaromaten enthalten, welche im Organismus z.T. in Arylamine umgewandelt werden. Besonderes Interesse erlangte in jüngster Vergangenheit das 3-Nitrobenzanthron als Umweltgift in Dieselabgasen. Diese Substanz zeigte im Ames-Test die höchste bisher gemessene Mutagenität aromatischer Mono-Nitroverbindungen [46]. Eine zusätzliche Quelle für Arylamine ist der Tabakrauch. Das erhöhte Risiko der Raucher für Blasenkrebs wird deshalb ebenfalls mit diesen Aminen in Zusammenhang gebracht.

Ein Hinweis auf weitere exogene Belastungsquellen sind auch die erhöhten Adduktraten im Blut von Kindern aus dicht besiedelten Ballungsräumen [82]. Als weitere Quellen für Arylamine wurden neuerdings Nahrungs- und Futtermittel erkannt [83]. Bedeutend ist auch die Verwendung von Aryldiaminen in Haarfärbemitteln [84] sowie die Verwendung von Benzidin und Abkömmlingen in den Azofarbstoffen, aus denen sie endogen durch Reduktion der Azogruppierung durch Darmbakterien oder durch Azoreduktasen in der Leber und anderen Geweben freigesetzt werden können [85].

2.3.2.2 *Biotransformation und Fremdstoffmetabolismus der aromatischen Amine*

Voraussetzung für die Entfaltung ihrer toxischen Wirkung und ihrer Fähigkeit zur Bildung von DNA-Addukten ist die metabolische Aktivierung der aromatischen Amine. Der Metabolismus wird anhand des 4-ABP beschrieben (Abb. 7).

Im Fall von 4-ABP und vieler anderer aromatischer Amine ist das Isoenzym CYP 1A2 verantwortlich für die Aktivierung zum N-Hydroxylamin [86]. In der Leber spielt das konstitutiv induzierbare Isoenzym CYP1A2 die Hauptrolle, ist aber zumindest im Mausmodell nicht essentiell für die kanzerogene Wirkung [87]. Das in der Leber gebildete N-Hydroxylamin wird durch hepatische N-Glukuronyltransferasen glukuronidiert. Sowohl das N-Hydroxylamin als auch das N-Glukuronid gelangen in den Blutkreislauf [45]. Im Erythrozyten wird

das Hydroxylamin durch Hämoglobin unter Bildung von Methämoglobin zum Nitrosobenzol oxidiert. Dies ist die Ursache für die toxikologisch relevante Methämoglobinämie, welche bei einer akuten Vergiftung auftreten kann [88]. Das Nitrosobenzol wird durch das Enzym Diaphorase (=Methämoglobinreduktase) in einer NADPH/H⁺-abhängigen Reaktion wieder zum N-Hydroxylamin reduziert, es kommt durch diesen von Kiese erstmals beschriebenen Zyklus zu einer autokatalytischen Methämoglobinbildung [89]. Beide Metaboliten werden in geringem Ausmaß renal ausgeschieden und erscheinen im Harn [88]. Durch Bindung der Nitrosfunktion an die Thiolgruppen des Cysteins als nukleophile Stelle im Hämoglobin kommt es zur Bildung von Hämoglobin- und Albuminaddukten, die man sich wegen ihrer Stabilität für das Biomonitoring zunutze macht. Bei Belastung mit niedrigen Dosen kanzerogener Arylamine stellt die Bindung an Hämoglobin eine Entgiftung dar. Aus Glutathionaddukten hingegen werden mittels Glutathionreduktasen die freien Amine zurückgebildet.

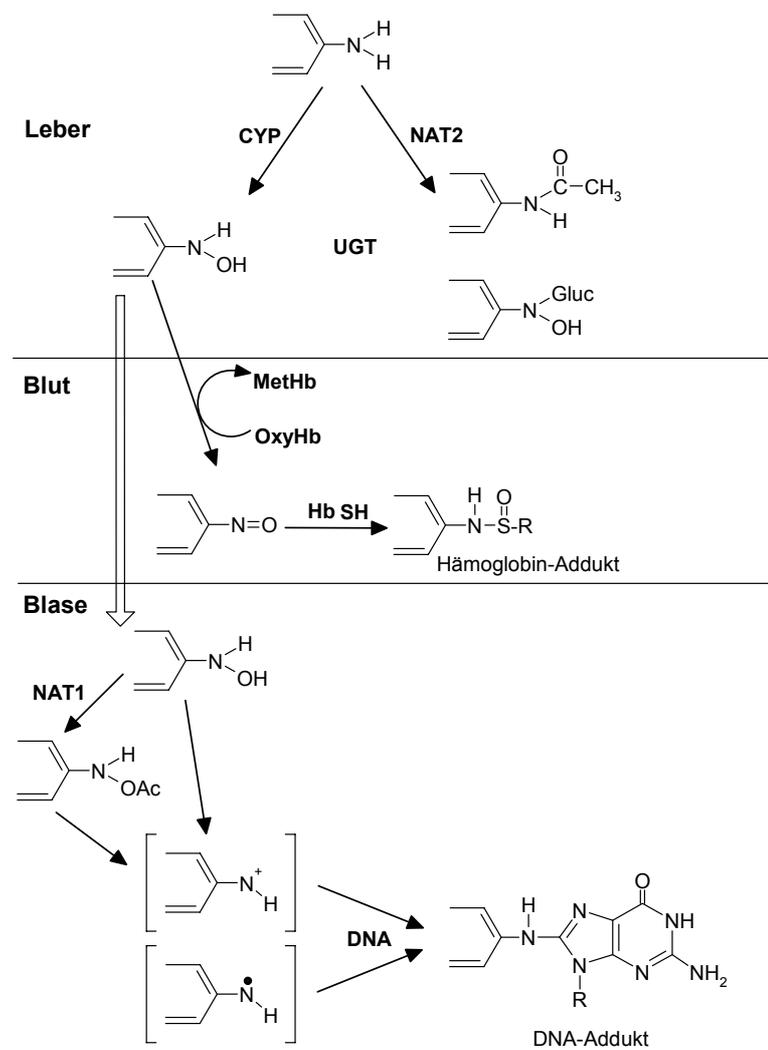


Abb. 7: Reaktionsschema von Arylaminen bei der Entstehung von Harnblasenkrebs

In den Zielorganen der Kanzerogenese kann das gebildete Hydroxylamin entweder direkt bei saurem pH oder nach O-Acetylierung durch die NAT1 über ein reaktives Nitreniumion zur DNA-Bindung führen. Im sauren Milieu des Blasenlumens wird das Hydroxylamin bei ca. pH 5 des Urins protoniert. Nach Abspaltung von Wasser entsteht ein instabiles, reaktives Nitreniumion, das mit der urothelialen DNA in einer elektrophilen Reaktion Addukte bilden kann [88]. Für aromatische Amine stellt das C8-Atom des Guanins den häufigsten Bindungs-ort an der DNA dar.

Neben der Aktivierung der aromatischen Amine über CYP1A2 spielt auch das Enzymsystem der N-Acetyltransferasen mit den beiden Isoenzymen NAT1 und NAT2 beim Metabolismus der Arylamine eine wichtige Rolle. NAT1 spielt eine wesentliche Rolle bei der metabolischen Aktivierung von aromatischen Aminen in der Harnblase. Durch die von NAT1 katalysierte O-Acetylierung können zusätzliche elektrophile N-Acetoxy-Derivate entstehen, die ebenfalls kovalent an die urotheliale DNA binden können [46,90]. Die Aktivität der NAT1 ist vor allem im extrahepatischen Gewebe erhöht und wird mit der Aktivierung von Kanzerogenen unter anderem in der Brust, im Kolon und in der Harnblase in Verbindung gebracht [90,91]. Eine Aktivität von NAT2 hingegen konnte in der Harnblase nicht nachgewiesen werden [91]. Die N-Acetylierung durch die NAT2 in der Leber ist im Gegensatz zur O-Acetylierung durch die NAT1 als eine Entgiftungsreaktion zu betrachten und wirkt laut epidemiologischen Studien der Aktivierung durch CYP1A2 entgegen. Neben der Leber findet die Expression der NAT2 beim Menschen noch im Dickdarm, dem Pankreas und der Brustdrüse statt. Da die NAT2 identisch ist mit der O-Acetyltransferase des Kolons, katalysiert sie sowohl die N-Acetylierung der Arylamine in der Leber als auch die O-Acetylierung der N-Hydroxymetaboliten im Kolon. Das N-Acetylamin kann dann durch CYP1A2 zum N-acetylierten N-Hydroxylamin oxidiert werden. Eine N-Acetylierung mit anschließender Transacetylierung (intramolekularer N,O-Acetyltransfer) findet in achtfach geringerem Ausmaß statt als die durch CYP1A2-katalysierte N-Oxidation der aromatischen Amine [92]. Die NAT2 ist polymorph, d.h. es gibt Varianten mit unterschiedlicher metabolischer Aktivität, kann aber im Gegensatz zu CYP1A2 durch exogene Faktoren kaum induziert werden [60,93-97]. Dies erklärt auch, dass schnelle Acetylierer mit hoher Konzentration an funktioneller NAT2 in der Leber bei gleicher Belastung mit aromatischen Aminen weniger Methämoglobin bilden und niedrigere Hämoglobinadduktraten aufweisen als langsame Acetylierer und daher weniger empfindlich gegenüber den Giftwirkungen der Arylamine sind [98]. Etwa die Hälfte der Deutschen haben ein defektes NAT2 und werden aufgrund dessen als langsame Acetylierer eingestuft [99]. Wie die N-Acetylierung stellt auch die N-Glucuronidierung der N-Hydroxylamine in der Leber primär

eine Entgiftungsreaktion dar. Das N-Glucuronid kann aber durch bakterielle Glucosidasen nach biliärer Ausscheidung im Darm oder bei Harnwegsinfektionen wieder gespalten werden. Im Darm führt dies zur Rückresorption des Hydroxylamins (enterohepatischer Kreislauf), in Zielorganen eventuell zur Aktivierung und DNA-Bindung. In letzterem Fall ist das N-Glucuronid als Transportform zu betrachten.

Bei der N-Hydroxylierung spielen genetische Einflüsse eine geringere Rolle. Die bis zu hundertfachen Unterschiede in der N-Hydroxylierungsaktivität in Humanlebermikrosomen werden überwiegend auf Umwelteinflüsse, das Rauchen und die Ernährung zurückgeführt [100]. Die Hämoglobinaddukte von 4-ABP sind bei vergleichbarer Belastung z.B. durch das Zigarettenrauchen bei langsamen Acetylierern, die gleichzeitig schnelle N-Hydroxylierer sind, eindeutig am höchsten. Entsprechende Angaben fehlen für die monocyclischen aromatischen Amine, obwohl diese in 10- bis 1000fach höherer Konzentration am Hämoglobin gebunden vorliegen. Untersuchungen haben das paradoxe Ergebnis gezeigt, dass sich mit zunehmender Passivrauchbelastung die Adduktwerte der Toluidine erniedrigen [82,101]. Die Bedeutung aktivierender und inaktivierender Enzyme ist für diese Amine so gut wie nicht charakterisiert. Daten zur Wechselwirkung dieser Amine untereinander gibt es nicht.

2.3.2.3 Toxizität

Neben der Blasenkanzerogenität als bedeutendster chronischer Giftwirkung besitzen die Arylamine auch eine mittlere bis starke akute Toxizität. Als akute Toxizität der monozyklischen aromatischen Amine ist die ausgeprägte Fähigkeit zur Methämoglobinbildung zu nennen. Diese beruht auf einer Verstoffwechslung der aromatischen Amine zu den entsprechenden Nitrosoverbindungen, die als ausgesprochene Methämoglobinbildner gelten. Bei bicyklischen aromatischen Aminen, bei welchen die Methämoglobinbildung eine untergeordnete Rolle spielt, stehen Leber- und Nierenschädigungen im Vordergrund.

2.3.2.4 Verwendete Aromatische Amine

Von den aromatischen Aminen wurden 2 Einzelsubstanzen mit hohem kanzerogenen Potential, 4-Aminobiphenyl (IARC Gruppe 1) und *o*-Toluidin (IARC Gruppe 2A), sowie eine Einzelsubstanz ohne bekanntes kanzerogenes Potential, *m*-Toluidin, zur Prüfung ausgewählt (Abb. 8).

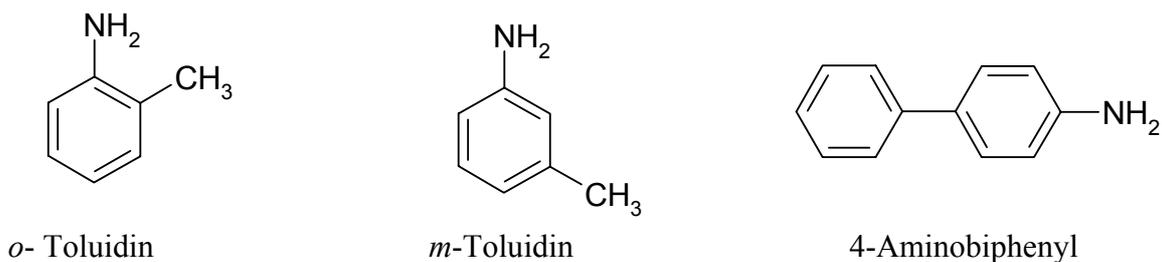


Abb. 8: Strukturen der untersuchten aromatischen Amine

2.3.2.4.1 4-Aminobiphenyl

4-Aminobiphenyl (Summenformel: C₁₂H₁₁N; MW: 169,23 g/mol) gehört zu den wenigen Substanzen, die als eindeutig krebserzeugend für den Menschen eingestuft werden (<http://www.cie.iarc.fr/monoeval/grlist.html>). Es wird in der Leber durch das konstitutive, induzierbare CYP1A2 N-hydroxyliert und in der Blase durch die NAT1 zur ultimalen DNA-bindenden Spezies O-acetyliert (Abb. 7). Alternativ wird es in der Leber durch die polymorphe NAT2 entgiftet. Wegen seines Vorkommens im Zigarettenrauch und der damit verbundenen höheren Belastung beim Raucher, die mit dem erhöhten Krebsrisiko der Raucher für die Harnblase korreliert, hat sich das 4-Aminobiphenyl zu einer Leitsubstanz der aromatischen Amine entwickelt, für die der Stoffwechsel und die DNA-Bindung sehr gut charakterisiert sind [44,102]. Nachdem in jüngsten Befunden 4-Aminobiphenyl Toxizität und Kanzerogenität auch bei *knock-out* Mäusen trotz fehlendem aktiven CYP1A2 gezeigt hat, sind Zweifel an der Rolle dieses Enzyms bei der Maus aufgekommen [87,103].

2.3.2.4.2 *ortho*-Toluidin

o-Toluidin (Summenformel: C₇H₉N; MW: 107,2 g/mol) ist ein monocyclisches aromatisches Amin mit stark kanzerogener Wirkung für die Blase, für das eine hohe Umweltbelastung besteht. Kinder aus Oberbayern hatten durchschnittlich 20mal höhere Hämoglobinaddukte von *o*-Toluidin als von 4-Aminobiphenyl [82]. Die Rolle von Humanenzymen in der Aktivierung diesesamins ist weitgehend unbekannt. In der menschlichen Zelllinie MCL-5 und in abgeschilferten Zellen aus Muttermilch und Harn konnte im Comet Assay eine Aktivierung von *o*-Toluidin nachgewiesen werden [104-106]. Im Rattenversuch induziert Phenobarbital die Hämoglobinadduktbildung stärker als der CYP1A2-Induktor 2-Naphthoflavon [107]. Dies stellt die Rolle von CYP1A2 als hauptsächlich aktivierendes Enzym bei der Ratte in Frage. Zur Bedeutung der N-Acetyltransferasen 1 und 2 hinsichtlich Aktivierung und Inaktivierung von *o*-Toluidin ist nichts bekannt.

2.3.2.4.3 *meta-Toluidin*

m-Toluidin (Summenformel: C₇H₉N; MW: 107,2 g/mol) ist nicht kanzerogen und erzeugt beim Menschen auch Hämoglobinaddukte, die im Vergleich zu den anderen Isomeren der Toluidine sogar noch höher ausfallen [108]. Daraus lässt sich auf eine nicht unerhebliche Belastung der Umwelt mit *m*-Toluidin schließen. Seine Rolle in Gemischen von aromatischen Aminen ist noch völlig unbekannt.

2.4 **Nachweis von kanzerogenen Wirkungen**

2.4.1 **Die Zelllinie V79MZ**

Die Zelllinie V79 wurde in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts aus morphologisch und neoplastisch transformierten Lungenfibroblasten eines adulten männlichen Chinesischen Hamsters etabliert [109]. Sie hat seitdem breite Anwendung in Toxizitäts- und Mutagenitätsstudien gefunden [110-112].

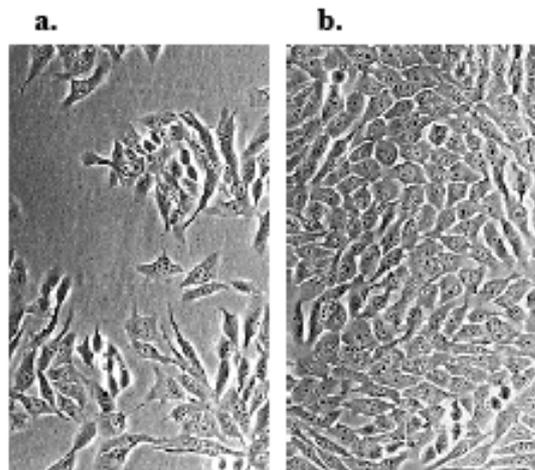


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahme parentaler V79-Zellen im Phasenkontrast bei 200-facher Vergrößerung bei 50%iger (a) und 100%iger (b) Konfluenz. Die Zellen wachsen während der G- und S- Phase flach am Boden angeheftet und besitzen zahlreiche Nukleoli. Mitotische Zellen, idealer Weise etwa 3% aller Zellen, runden sich vorübergehend ab. Nach Durchlaufen der Mitose breiten sich die Tochterzellen im Medium aus, heften sich wieder an und bilden einen immer dichteren Zellrasen. V79-Zellen besitzen keine messbare endogene Cytochrom P450-Aktivität. Der in dieser Arbeit verwendete Mainzer Subklon V79MZ wurde hinsichtlich seiner endogenen Enzymausstattung eingehend charakterisiert [113,114]. Im Gegensatz zum Neuherberger Subklon V79NH enthält er keine nennenswerte N-Acetyltransferaseaktivität [23].

Die Verdopplungszeit von V79-Zellen ist mit durchschnittlich 10-12 Std. im Vergleich zu allen anderen Zelllinien die bislang kürzeste. Sie wachsen adhärent in Einzelschichten. V79-Zellen lassen in ihrer Morphologie (spindelförmige Zellgestalt, Faserproduktion) den Ursprung aus dem Bindegewebe deutlich erkennen. Bei 100%iger Konfluenz beträgt die

Zelldichte etwa 5×10^7 Zellen pro 150 cm^2 (Abb. 9), entsprechend einer Gesamtproteinmenge von 5 mg bzw. 1,5 mg mikrosomalem Protein.

Glatt et al. [114] fanden in V79-Zellen zwar Cytochrom-P450-Reduktase- und Epoxidhydrolyase-, aber keinerlei Monooxygenaseaktivität. Die Zellen besitzen eine hohe Aktivität von Glutathion-S-Transferasen, aber keine endogene Aktivität von UDP-Glucuronosyltransferasen [115,116] oder Enzymen der SULT-Superfamilie.

In vivo-Systeme, wie sie beispielsweise Versuchstiere repräsentieren, sind sehr komplex, haben einen unspezifischen Hintergrund, sind nur eingeschränkt standardisierbar und spielen daher bei der Beantwortung mechanistischer Fragestellungen nur eine untergeordnete Rolle. Demzufolge sind die aus Inhibitions-, Induktions- und *knock-out*-Studien resultierenden Daten oft widersprüchlich und nur bedingt miteinander vergleichbar. Rekombinante *in vitro*-Testsysteme sind dagegen durch eine gute Standardisierbarkeit, hohe Spezifität, niedrige Komplexität und hohe Prädiktivität gekennzeichnet. Dies trifft auch für das V79-Expressionssystem zu.

Im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen bieten V79-Zellen eine Vielzahl toxikologischer Endpunkte bei niedrigem und stabilem Hintergrund und eignen sich daher besonders für Mutagenitäts- und Toxizitätsstudien [111]. Insbesondere zeichnen sich V79-Zellen gegenüber allen anderen Säugerzelllinien, einschließlich solcher vom Menschen, durch einen außergewöhnlich stabilen, pseudodiploiden Karyotyp mit konstanter Chromosomenzahl aus, der auch nach Transfektion mit Fremd-DNA erhalten werden kann [117]. Dies ist gerade im Hinblick auf cytogenetische Endpunkte entscheidend. V79-Zellen haben darüber hinaus eine sehr kurze Generationszeit von weniger als 12 Stunden und lassen sich mit hoher Klonierungseffizienz stabil transfizieren [118]. Für die Spezifität des Testsystems spricht, dass die hier verwendeten V79-Zellen des sogenannten Mainzer Subklons (V79MZ) weder endogenes Cytochrom P450 [119,120] noch signifikante *N*-Acetyltransferase-Aktivitäten aufweisen [23]. Daher sind sie sowohl für das transfizierte Cytochrom P450-Isoenzym, als auch für die polymorphen Formen der *N*-Acetyltransferase Typ 2 exakt definiert.

Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich Zellkulturen (V79-Zellbatterie) mit speziellen Eigenschaften zur metabolischen Aktivierung konstruieren, vorrangig den Cytochromen P450 des Menschen, mit denen schnell und genau toxische Wirkungen untersucht werden können. Die Ergebnisse sind besonders wegen der gentechnologischen Konstruktion mit Enzymen des Menschen von unmittelbarer Relevanz für die Risikobewertung beim Menschen. Es werden

speziesbedingte Unterschiede vermieden und die Notwendigkeit von Tierversuchen wird verringert.

2.4.2 Bewertung von Stoffgemischen

Die gentechnologisch konstruierte V79-Zellbatterie soll eingesetzt werden, um ein dringendes Problem der Umwelttoxikologie zu lösen, nämlich die Bewertung der Toxizität von Stoffgemischen. Während die toxikologische Bewertung von Einzelsubstanzen in den vergangenen Jahrzehnten das vorrangige Problem darstellte, wurde zunehmend deutlich, dass es zur toxikologischen Bewertung der realen Exposition des Menschen gegenüber Stoffgemischen eines anderen Konzeptes bedarf als das, welches zur toxikologischen Bewertung von Einzelsubstanzen angewendet wird.

Das dringendste Problem in der Risikoabschätzung von Stoffgemischen besteht darin, zu klären, ob sich die Toxizität des Gemisches von der Summe der Toxizitäten der Einzelsubstanzen unterscheidet, ob sie entweder geringer oder höher ausfällt. Um dies beurteilen zu können, muss geklärt werden, ob die Einzelstoffe in Stoffgemischen untereinander Wechselwirkungen eingehen können oder nicht. Die Art der Wechselwirkung kann grundsätzlich synergistischer oder antagonistischer Art sein. Eine synergistische Wechselwirkung liegt vor, wenn die kombinierte Wirkung zweier oder mehrerer Einzelstoffe größer als die bloße Addition der Wirkungen der Einzelstoffe ist. Antagonistische Effekte treten dann auf, wenn die Ausprägung der toxischen Wirkungen der Einzelstoffe in Gemischen gegenseitig behindert wird, so dass die Summe der Toxizität geringer als die bloße Addition der Wirkungen der Einzelstoffe ist.

2.4.3 Cytotoxizität

2.4.3.1 MTT Assay

Der MTT-Test wurde zur Messung der Aktivität der Succinatdehydrogenase in lebenden V79-Zellen angewendet [79]. Dieses mitochondriale Enzym katalysiert im Citratzyklus durch Dehydrierung die Umwandlung von Succinat zu Fumarat und ist eng mit der Atmungskette verbunden. Das Enzym gibt somit Aufschluss über die metabolische Aktivität der Zellen. Grundprinzip dieses Testes ist die wasserstoffabhängige Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu lila Formazankristallen (Abb. 10). Dabei dringt das MTT in die Zellen ein, der Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und

schließlich entsteht das alkohollösliche dunkelblaue Formazan, welches spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm nachgewiesen werden kann.

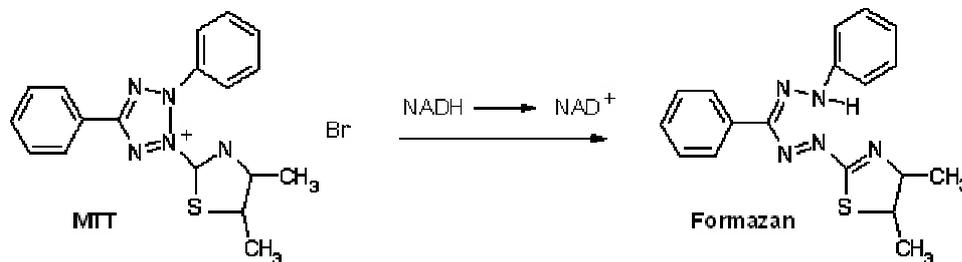


Abb. 10: Umwandlung von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu Formazan

2.4.4 Genotoxizität: Nachweis von Mutationen *in vitro*

2.4.4.1 Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-(HPRT-)-Test zur Erfassung der Mutagenität

Der HPRT-Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Kanzerogene in Säugetierzellen. Der Test wird zur Feststellung chemisch induzierter Genmutationen angewendet und ist zum Nachweis von Basenpaarmutationen, Frameshiftmutationen und kleineren Deletionen geeignet.

Der HPRT-Locus repräsentiert eine Genregion, die einer besonders erhöhten Mutationsfrequenz unterliegt. Das HPRT-Gen stellt aufgrund seiner mittleren Größe und Exon-Intron-Struktur ein repräsentatives Gen für Mutationsuntersuchungen dar. Besonders eignet es sich aufgrund der Möglichkeit, Zellen zu selektieren, die eine Mutation in diesem Gen tragen. Die HPRT ist ein Enzym, welches freie Purinbasen in Nucleosidmonophosphate umwandelt und sie dadurch für die Synthese von Nucleinsäuren zur Verfügung stellt. Dieser Reaktionsweg dient der Wiederverwertung von Purinen, die durch enzymatischen Abbau aus Nucleotiden entstanden sind (*purine salvage pathway*) und stellt einen energiesparenden Weg zur Synthese von Purinnucleotiden dar. Die HPRT ist jedoch nicht essentiell, denn Purinnucleotide können von der Zelle auch über eine energieaufwendigere Neusynthese hergestellt werden. Es ist daher möglich, einen der beiden Wege zu blockieren, ohne die Lebensfähigkeit der Zelle einzuschränken. Die HPRT erkennt neben den Purinen Hypoxanthin und Guanin auch die Purinanaloga 6-Thioguanin und 8-Azaguanin als Substrat. Für die Zelle sind diese modifizierten Nucleosidmonophosphate letal [121,122]. Die Mutagenese des HPRT-Gens kann verfolgt werden, indem die Zellen einem 6-Thioguanin-haltigen Medium ausgesetzt werden (Abb. 11).

Zellen, die eine funktionsstörende Mutation in ihrem HPRT-Gen besitzen, sind aufgrund der fehlenden HPRT-Aktivität resistent gegenüber den toxischen Purinanaloga und überleben in einem Medium, das 6-Thioguanin enthält. Der HPRT-Mutagenitätstest nutzt diese Resistenz zur Selektion von Mutanten. Die Zahl der Kolonien ist ein Maß für das mutagene Potenzial eines Fremdstoffes und seiner Metaboliten. Dabei werden alle Mutationen erfasst, die eine Funktionsstörung des HPRT-Enzyms verursachen. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine Selektion auf HPRT-Mutanten ist die funktionelle Hemizygotie, so dass eine rezessive Mutation zur Manifestation eines HPRT-defizienten Phänotyps ausreicht. Bei allen bisher untersuchten Säugetieren ist das HPRT-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert [123,124].

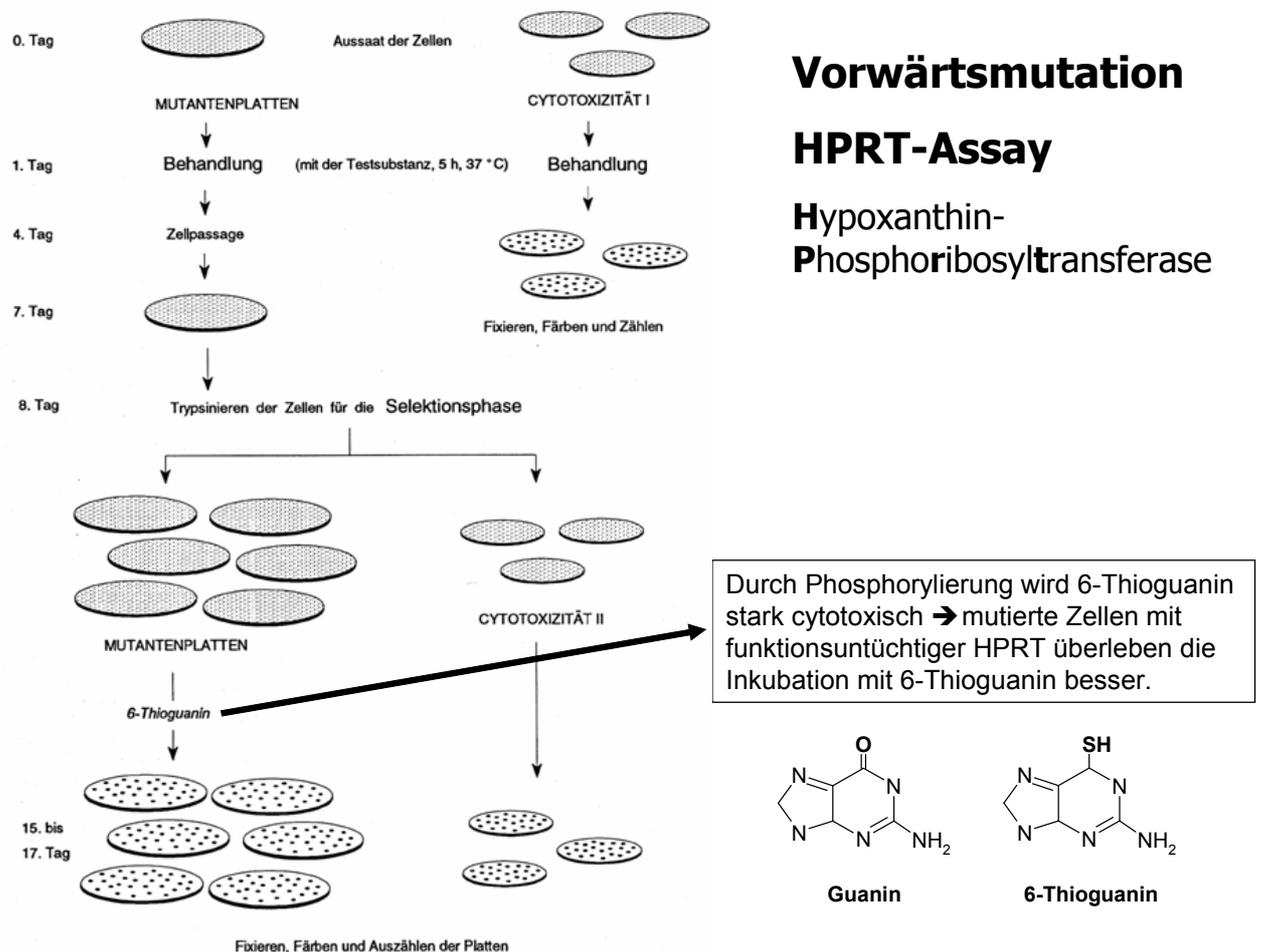


Abb. 11: Ablauf des HPRT-Assays (modifiziert nach Greim und Deml [125])

2.4.5 Nachweis von Chromosomenschäden *in vitro*: Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet Assay) zur Erfassung genotoxischer Effekte

Ein Genotoxizitätstest, der in den letzten Jahren aufgrund seiner Sensitivität und einfachen Handhabung an Bedeutung gewonnen hat, ist die Einzelzellgelelektrophorese (SCGE oder Comet Assay) [126,127]. Der Comet Assay ist eine mikrogelelektrophoretische Technik, die ermöglicht, DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüche einzelner Zellen zu untersuchen. Der Assay hat seinen Namen aufgrund der typischen, an Kometen erinnernden Ausbildung von elektrophoretisch aufgetrennter DNA erhalten (Abb. 12). Er ermöglicht die Darstellung von DNA-Schädigungen, die durch biologische, physikalische oder chemische Noxen an Einzelzellen induziert werden. Der Comet Assay weist in seiner alkalischen Version hauptsächlich Einzelstrangbrüche nach, die gegenüber Doppelstrangbrüchen weitaus häufigere substanzinduzierte Form [128,129]. Darüber hinaus kann ein Teil der gemessenen DNA-Fragmente aus einer Exzisions-Reparatur der DNA stammen [130]. Hierbei zeigt die DNA einzelner Zellen nach Behandlung unter Elektrophoresebedingungen eine Wanderung in Anodenrichtung, proportional zu dem Ausmaß der induzierten Schädigung. Die Migration wird durch die Schädigung des Kerninhalts und die Auflösung der Verdrillung der DNA möglich. DNA-Fragmente haben eine elektrische Polarisierung und wandern in Anodenrichtung. Je höher die Fragmentierung, desto höher ist der Anteil der sich am Schluss der Elektrophorese im Schweif des Kometen befindlichen DNA in Relation zur ungeschädigten DNA im Kopf. Hierbei geht der Anteil der DNA im Schweif multipliziert mit der mittleren Wegstrecke in das *Olive Tail Moment* ein [131], das somit ein quantitatives Maß der DNA-Strangbrüche darstellt.

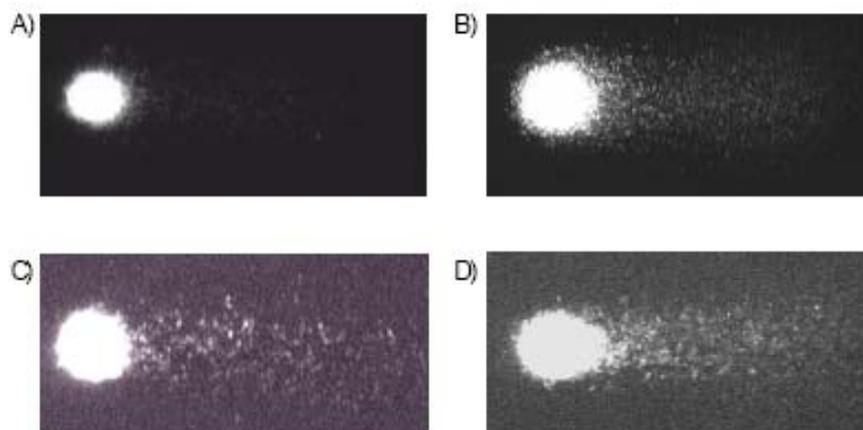


Abb. 12: Mit Ethidiumbromid angefärbte Zellkerne nach Durchführung des Comet Assays. A) Zelle ohne erkennbare DNA-Schäden, B) geringe DNA-Migration, C) und D) zunehmende DNA-Migration.

Zur Durchführung wird eine Einzelzellsuspension verwendet (Abb. 13). Die Zellen werden in Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen. Darauf erfolgt die Lyse der Zellen, in deren Verlauf die Zellmembranen und Proteine zerstört werden. Für den Nachweis von Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen wird eine Alkalidenaturierung der DNA mit anschließender Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Die Präparate werden dann mit einem DNA-bindenden Farbstoff angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Zellen mit runden Zellkernen werden als Zellen ohne nachweisbare DNA-Schäden angesehen. In Zellen mit DNA-Schäden wandert chromosomale DNA aus dem Kernbereich in Richtung der Anode.

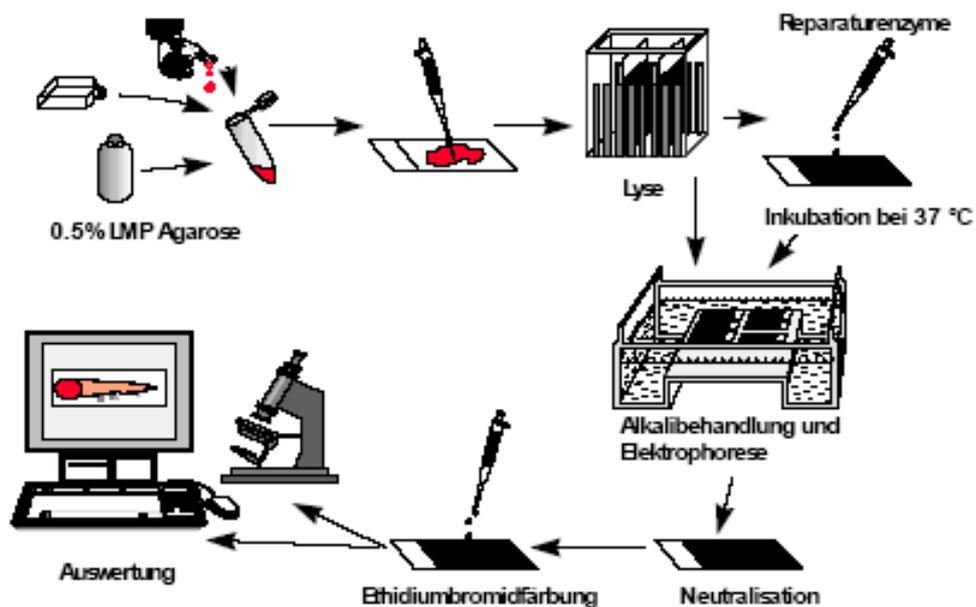


Abb. 13: Ablaufschema des Comet Assays [132]

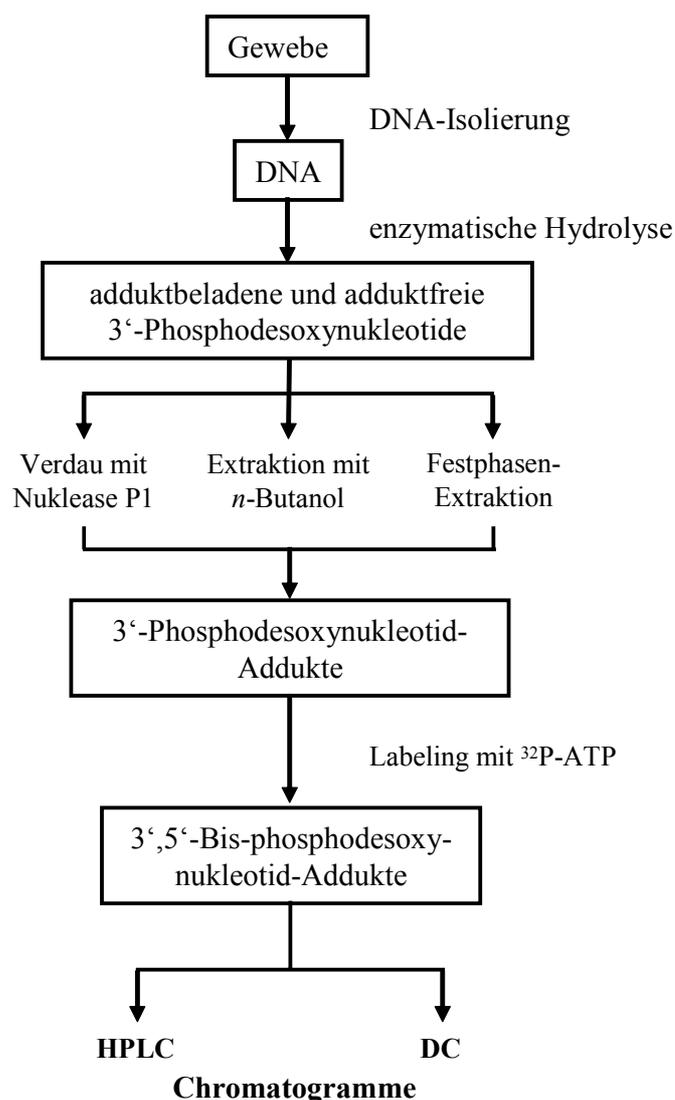
2.4.6 Kovalente Bindung von Fremdstoffen an die DNA

2.4.6.1 ³²P-Postlabeling-Verfahren zum Nachweis von DNA-Addukten

Das ³²P-Postlabeling stellt eine Methode zum Nachweis von Fremdstoffen dar, die kovalent an Basen der DNA gebunden sind. Sie ist die zur Zeit empfindlichste Methode, mit der bei Verwendung von 10 µg DNA der Nachweis von 1 bis 10 Addukten in 10¹⁰ normalen Nukleotiden gelingt [133].

Anfang der achtziger Jahre wurde die Methode von Reddy, Gupta und Randerath entwickelt. [134,135]. Seit der Veröffentlichung dieser Methode wurden viele Modifikationen durchgeführt. Die Methode besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten (Abb. 14): Zunächst

wird DNA aus Gewebeproben oder aus Zellen gewonnen und enzymatisch zu den entsprechenden Desoxyribonukleotid-3-Monophosphaten verdaut. Diese werden mit Hilfe von T4 Polynukleotidkinase und unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zu den entsprechenden $[\text{5-}^{32}\text{P}]\text{Desoxyribonukleotid-3,5-Diphosphaten}$ phosphoryliert und dabei radioaktiv markiert. Der hohe Überschuss an normalen Nukleotiden macht es notwendig, die modifizierten Nukleotide anzureichern und damit die Empfindlichkeit des Verfahrens zu steigern. Dies kann durch Extraktion mit Butanol oder durch Behandlung mit Nuklease P1 erfolgen. Die Nuklease P1 dephosphoryliert eine Reihe von adduktbeladenen Nukleotiden deutlich schlechter als die normalen Nukleotide. Dies gilt besonders für Addukte von PAK, den sog. *bulky adducts*. Bei den Addukten aromatischer Amine ist die Butanol-Extraktionsmethode von Vorteil, weil die Aminaddukte durch die Nuklease P1 größtenteils dephosphoryliert werden. [136]. Die Anreicherung von Addukten kann auch chromatographisch erfolgen, z.B. durch HPLC oder Immunchromatographie oder mit Hilfe der Festphasenextraktion [137]. Danach werden die



modifizierten Nukleotide chromatographisch von den normalen Nukleotiden getrennt und anschließend erfolgt die Auftrennung verschiedener Addukte. Die markierten Addukte werden durch Autoradiographie und Szintillationsmessung quantifiziert.

Abb. 14: Nachweis von DNA-Addukten mittels ^{32}P Post-labeling

3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Toxizität von Umweltchemikalien in gentechnisch veränderten Zellen. Am Modell der V79 Zelllinie sollte die Rolle einer Metabolisierung durch humane Enzyme aus der Reihe der Cytochrome P450 und der N-Acetyltransferase 2 für die Cytotoxizität, Genotoxizität und Mutagenität für ausgewählte Substanzen aus der Klasse der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe und der aromatischen Amine aufgeklärt werden. Eindeutig kanzerogene und nicht kanzerogene Verbindungen sollten alleine und in Kombination getestet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Laborgeräte

Bezeichnung

8-Kanal-Pipette, 30-300 µl
 Analysenwaage, Mettler
 Analysenwaage, precision A-150-SX
 Autoklav, Varioklav Dampfsterilisator

 Brutschrank Hera Cell 240
 Digital pH Meter Ino Lab pH Level 1
 Einfrierbehälter, Cryo 1C Freezing Container, -1°C/min
 Elektrophorese Consort Power Supply E 835
 Fluoreszenzmikroskop BX 60
 Fluoroscans Ascent CF
 Fuji BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer mit Software BAS Reader for Tina
 Elektrophoresekammer
 Heissluftsterilisator
 HG-Lampe U-RFL-T
 Kolonienzähler, Hand-Stückzähler
 Kühlpumpe C 25 P
 Kühlzentrifuge, Mikro 22R
 Lichtmikroskop Axiovert 135M
 Magnetrührer, MAG-H
 Minifuge GL
 Multilabel Counter 1420 Victor²
 Multipette plus
 Neubauer-Zählkammer
 Pipetten Eppendorf Research: Modelle: 0,5-10; 10-100; 20-200; 100-1000 µL
 Pipettus-Akku, pipetboy acu, elektrische
 Pipettierhilfe für serologische Meßpipetten
 Rotlichtlampen dukalux SL
 Rubber Policeman (Gummiwischer)
 Sterilbank, Hera safe
 Thermomixer 5436
 Tischzentrifuge Hettich Mikro 22 R
 Ultraturrax T25

Hersteller

Eppendorf, Hamburg
 Spoerhase A.G. Giessen
 Cobos, Hamburg
 H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
 Heraeus-Kendro, Langensebold
 WTW GmbH, Weilheim
 Nalgene, Wiesbaden

 Roth, Karlsruhe
 Olympus, Hamburg
 Thermolab, Düsseldorf
 Raytest, Straubenhardt

 Pharmacia Biotech, Freiburg
 Werner, Görlitz
 Olympus
 Stucki, Hannover
 Thermo Haake, Karlsruhe
 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
 Carl Zeiss, Göttingen
 Bachofer, Reutlingen
 Heraeus-Kendro
 Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
 Eppendorf
 Brand, Wertheim
 Eppendorf

 Integra Biosciences AG, Chur

 Kindermann, Ochsenfurt
 Nunc, Wiesbaden
 Heraeus-Kendro
 Eppendorf
 Hettich Zentrifugen
 Bachofer

Vacuum Centrifugal Concentrator
 Vortex-Rüttler, VF 2
 Waage, Delta Range, Mettler PC 440
 Wasserbad, LAUDA Thermostat

Bachofer
 IKA-Labortechnik, Staufen
 Mettler Waagen GmbH, Giessen
 Messgeräte Werk Lauda, Chur

4.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

6-well Platte, steril
 96-well Mikrotiterplatte, steril
 Chromatographiepapier (1,3 mm)
 Chromatographiepapier Nr. 17 und Nr. 1
 Combitips plus; 5 und 10 mL
 Deckgläser, 24x60 mm
 Einmalspritzen: 5, 10, 50 mL, steril
 Gewebekulturflaschen: 25, 75, 175 cm², steril
 Gewebekulturschalen (92x17 mm), Petrischalen
 Kanülen, Sterican: 0,90 x 40 mm
 Kryobehälter, *cryo sleeve*
 Objektträger, extra weißes 76x26 mm Glas mit
 5 mm Mattrand an beiden Längsseiten
 Pasteurpipetten, 23 mm
 PEI-Folien, Polygram CEL 300 PEI DC
 Pipettenspitzen:
 Ep T.I.P.S.: 0,5-20; 2-200; 20-300; 50-1000 µL
 Reaktionsgefäße: 1,5 und 2 mL
 Reaktionsgefäße: 15 und 50 mL, steril
 Rotilabo-Spritzenfilter, steril: 0,22 µM, PVDF
 Serologische Pipetten: 2, 5, 10, 25 mL; einzeln,
 steril verpackt

Hersteller

Nunc, Wiesbaden
 Nunc
 Schleicher und Schüll, Dassel
 Whatman, Maidstone
 Eppendorf
 R. Langenbrinck, Emmendingen
 B. Braun, Melsungen
 Greiner, Frickenhausen
 Nunc
 B. Braun
 Nalgene
 R. Langenbrinck
 Fisher Scientific, Schwerte
 Macherey und Nagel, Düren
 Eppendorf
 Eppendorf
 BD-Falcon, Heidelberg
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 BD-Falcon, Heidelberg

4.3 Chemikalien

Bezeichnung

2-Aminofluoren
 4-Aminobiphenyl
 Ammoniumchlorid
 Ammoniumformiat
 Ampicillin
 Aqua-Phenol
 Benzo[a]pyren

Hersteller

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Sigma-Aldrich
 Merck, Darmstadt
 Fluka, Neu-Ulm
 Sigma-Aldrich
 Appligene-Oncor, Heidelberg
 Sigma-Aldrich

BSA, <i>bovine serum albumin</i>	NewEnglandBiolabs, Schwalbach
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dibenzo[a,l]pyren	Biochemisches Institut für Umwelt- carcinogene, Grosshansdorf
Dicumarol	Sigma-Aldrich
DMBA	Sigma-Aldrich
DMEM-Medium	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich
Eisessig, p.a. 100%	Roth
Ethanol 70%	Roth
Ethanol, p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FCS, <i>foetal calf serum</i>	Gibco-Invitrogen
Geneticin 418-Lösung 50 mg/mL	Gibco-Invitrogen
Glucose-6-Phosphat	Applichem, Darmstadt
H ₂ O, Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
HCl, Salzsäure 37%	Merck
HEPES	Applichem
Hygromycin B	Applichem
Isopropanol, 1-Propanol	Merck
KCl	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
KOH	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Merck
LE Agarose, Sea Kem	Biozym, Hessisch Oldendorf
L-Glutamin, 200 MM (100x)	Gibco-Invitrogen
LMP Agarose, <i>Sea Plaque GTG agarose</i>	Biozym
<i>meta</i> -Toluidin	Sigma-Aldrich
Methanol p.a,	Merck
MgCl ₂ *6 H ₂ O	Merck
MNNG	Sigma-Aldrich
MTT	Roth
Na ₂ HPO ₄ , Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
NaCl	Merck
NADH-Na ₂	Applichem
NADPH	Applichem
NADPH-Na ₄	Applichem
NADP-Na ₂	Applichem
NaF	Sigma-Aldrich

NaOH	Merck
n-Butanol	Sigma-Aldrich
N-Lauroyl Sarconisat	Sigma-Aldrich
<i>ortho</i> -Toluidin	Sigma-Aldrich
PBS, <i>phosphate buffered saline</i> , steril	Gibco-Invitrogen
Penicillin/Streptomycin; 10.000 units/mL	Gibco-Invitrogen
Penicillin G-Natrium und 10.000 µg/mL	
Streptomycin Sulfat in 0,85% NaCl	
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich
Pyren	Fluka
SDS	Sigma-Aldrich
Tetrabutylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Thioguanin, 2-Amino-6-mercaptapurin	Sigma-Aldrich
Tris	Merck
Triton X 100	Roth
Trypanblau; 0,4% in 0,85% NaCl	Gibco-Invitrogen
Trypsin/EDTA (1x) in HBSS W/O CA&MG	Gibco-Invitrogen
W/EDTA 4 Na	

4.4 Lösungen

Komplett-Medium (DMEM^{Komplett})

10% FCS	50 mL/500 mL
2 mM Glutamin	5 mL/500 mL
100 IU/mL Pen. /100 µg/mL Strep.	5 mL/500 mL

MTT-Lösung

Stammlösung: c= 5 mg/mL:

250 mg MTT in 50 mL PBS-Puffer lösen und steril filtrieren

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:5 mit DMEM^{Komplett} verdünnen

Kofaktor-Lösung

67,0 mg Glucose-6-Phosphat-Na₂ x 2 H₂O

22,9 mg NADP-Na₂ x 4 H₂O

23,6 mg NADH-Na₂ x 3 H₂O

10,1 mg NADPH-Na₄ x 4 H₂O

in 1 mL gekühlte PBS lösen und auf pH 7,4 (mit 0,1 M NaOH bzw. mit 0,1 M HCl)

einstellen, anschließend steril filtrieren. Erst kurz vor Gebrauch herstellen und auf Eis lagern.

Thioguanin-Stammlösung (HPRT Assay)

250 mg 6-Thioguanin werden in 50 mL aqua dest., welches mit 1 mL 0,5 M NaOH-Lösung versetzt wurde, gelöst und steril filtriert.

Lagerung bei -20°C.

Thioguaninhaltiges Medium (HPRT Assay)

700 µl Thioguanin-Stammlösung auf 500 mL DMEM^{Komplett}

Kristallviolett-Lösung (HPRT Assay)

1-5 g/L Methanol-Eisessig (3:1)

0,9%ige NaCl-Lösung (HPRT Assay)

9 g NaCl auf 1 L aqua dest.

PBS 1x (ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺)

8,0 g NaCl (137 mM)

0,2 g KCl (2,7 mM)

2,5 g Na₂HPO₄ (14 mM)

0,2 g KH₂PO₄ (1,4 mM)

auf 1 L H₂O dest. und pH auf 7,4 einstellen.

Lyse-Lösung (Comet Assay)

146,1 g NaCl (2,5 M)

29,2 g EDTA (100 mM)

1,2 g Tris (10 mM)

1% Na Lauroyl Sarcosinat

auf 1 L H₂O dest. und pH auf 10,0 mit NaOH einstellen; 60 min. vor Gebrauch 89 mL mit 10 mL DMSO und 1 mL Triton versetzen und bei 4°C aufbewahren.

Elektrophoresepuffer (Comet Assay)

48 g NaOH (300 mM)

1,168 g EDTA (1 mM)

auf 4 L H₂O dest. Kurz vor jedem Lauf frisch ansetzen und auf 3 °C kühlen.

Neutralisierungslösung (Comet Assay)

48,46 g Tris (0,4 M)

auf 1 L H₂O dest. pH auf 7,5 mit HCl einstellen.

Färbelösung (Comet Assay)

20 µg/mL Ethidiumbromid

von 10 x Stammlösung (200µg/mL), 1:10 Verdünnung mit H₂O dest.

Nukleotidpuffer (Postlabeling/DNA-Hydrolyse)

1,18 g CaCl₂ x 2 H₂O auf 100 mL H₂O dest (80 mM)

2,36 g Na-Succinat auf 100 mL H₂O dest (200 mM)

davon je 10 mL zusammengeben und mit NaOH auf pH 6,0 einstellen und mit auf 100 mL H₂O dest. auffüllen.

Proteinase K

Originalfläschchen (100 mg) wurde mit 2 mL H₂O (Ampuwa) aufgefüllt → 50 mg/mL;

Portionen à 200 µL bei -20°C gelagert.

RNase A

Originalfläschchen (50 mg) wurde mit 5 mL 0,1 M NaCl, pH 5,0 aufgefüllt → 10 µg/mL;

Portionen à 500 µL bei -20°C gelagert.

RNase T1

Originalfläschchen (5000 U) wurde mit 500 µL H₂O (Ampuwa) aufgefüllt → 51 U/µL;

Portionen à 50 µL bei -20°C gelagert.

Micrococcus Nuclease (MN)

Originalfläschchen (200 U) wurde mit 833 µL H₂O (Ampuwa) aufgefüllt → 0,24 U/µL;

Portionen à 10 µL bei -20°C gelagert.

Phosphodiesterase (PDE)

Inhalt des Original-Fläschchens in ca. 700 µl Wasser lösen, in einen Dialyseschlauch geben und gegen je 1 L H₂O dest. dreimal dialysieren (6 h/über Nacht/6 h). Das Endvolumen wird bestimmt und so die tatsächliche Konzentration ermittelt.

Kinasepuffer (10x)

Tris/HCl (300 mM)

MgCl₂ (100 mM)

DTT (100 mM)

Spermidin (10 mM)

Auf 2,5 mL H₂O dest.; pH auf 9,5 einstellen; bei -20°C lagern.*ATP-Stammlösung*50 pmol/μL in H₂O (Ampuwa)*Hotmix*

2 μL Kinasepuffer

0,6 μL T4-Polynukleotidkinase

100 μCi γ-³²P-ATP

40 pmol ATP

Auf 5 μL mit H₂O (Ampuwa) auffüllen**4.5 Enzyme****Bezeichnung****Hersteller**

Micrococcus Nuklease

Sigma-Aldrich

Nuklease P1

Sigma-Aldrich

Phosphodiesterase

Boehringer Mannheim, Mannheim

Phosphodiesterase

Sigma-Aldrich

Proteinase K

Sigma-Aldrich

RNase A

Sigma-Aldrich

RNase T1

Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden

T4 Polynucleotidkinase

Pharmacia-Biotech GmbH, Freiburg

4.6 Biochemikalien**Bezeichnung****Hersteller**

ATP

Boehringer Mannheim, Mannheim

[γ-³²P]-ATP, 7000 Ci/mmol

ICN, Eschwege

[γ-³²P]-ATP, 3000 Ci/mmol

Isotopchim, Ganagobie; Frankreich

Bicin	Sigma-Aldrich
Desoxyguanosin	Sigma-Aldrich
Desoxyguanosin-3'-monophosphat	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleotid-3'-monophosphat	Sigma-Aldrich
Ribonukleotid-3'-monophosphat	Sigma-Aldrich
Spermidin	Sigma-Aldrich

4.7 Zellbiologische Materialien und Methoden

4.7.1 Verwendete Zelllinien

Folgende bereits etablierte Zelllinien von GenPharmTox (Martinsried) wurden eingesetzt: V79MZ parental [113,114], V79MZ1A1, V79MZ1A2, V79MZ1B1 sowie V79MZ1A2/NAT2*4.

4.7.2 Kultivieren von V79MZ-Zellen

V79MZ-Zellen wurden bei 37 °C, 7% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in speziell beschichteten Gewebekulturgefäßen oder 24er- und 96er-Gewebekulturmikrotiterplatten in DMEM-Kulturmedium mit erhöhtem Glukosegehalt (4,5 g/L) kultiviert. Zusätzlich wurde das DMEM-Kulturmedium mit 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin supplementiert ("Komplettmedium"). Nach Transfektion wurden Geneticin 418- oder Hygromycin B-resistente V79MZ-Zellklone mit 1 mg Geneticin 418/mL-Komplettmedium bzw. 0,4 mg Hygromycin B/mL-Komplettmedium kultiviert.

4.7.3 Ablösen von V79MZ-Zellen mittels Trypsin/EDTA

Das Medium wurde abgesaugt, zweimal mit 5 mL PBS nachgespült und die Zellen durch 5 min Inkubation in 2 mL 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA bei 37 °C vom Substrat abgelöst und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pipette sorgfältig vereinzelt. Das Trypsin wurde nach erneuter Zugabe von Komplettmedium durch die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren wieder inaktiviert.

4.7.4 Passagieren von V79MZ-Zellen

Um die Konfluenz stets unter 100% zu halten, wurden die Zelllinien regelmäßig passagiert. Dazu wurde ein Großteil der trypsinierten Zellen verworfen oder in neue Kulturgefäße umgesetzt.

4.7.5 Einfrieren von V79MZ-Zellen

Die trypsinierten Zellen wurden in 10 mL Kompletmedium durch 10 min Zentrifugation bei 800 rpm und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in eisgekühltem Kompletmedium mit 10% DMSO resuspendiert und aliquotiert in 1,8 mL Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Nach 24–168 Std. wurden die so vorbehandelten Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.7.6 Auftauen von V79MZ-Zellen

Gefrorene Aliquots wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 mL Kompletmedium aufgenommen und 10 min bei 800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets mit 7 mL Kompletmedium. Nach 2–4 Std. wurden die Zellen hinsichtlich Vitalität und Morphologie kontrolliert. Die Vitalität der aufgetauten Zellen war dabei stets größer als 90%.

4.7.7 Herstellen von Zellhomogenat

V79MZ-Zellen in drei 250 mL-Gewebekulturflaschen wurden bis zu 80–100%iger Konfluenz kultiviert. Die trypsinierten Zellen wurden vereinigt, gleichmäßig auf je drei 145/20 mm-Gewebekulturschalen pro 250 mL-Gewebekulturflasche verteilt und in 20 mL Kompletmedium ohne G418 oder Hygromycin B bis zu 90%iger Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde verworfen und zweimal mit 5 mL eisgekühltem Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) nachgespült. Die Zellen wurden in 3 mL eisgekühltem Puffer mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst, vereinigt und durch 10 min Zentrifugation bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 mL Puffer pro 145/20 mm-Gewebekulturschalen sorgfältig resuspendiert. Zur Bestimmung des Proteingehaltes und der enzymatischen Aktivität wurden die Suspensionen umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Zellen aufzubrechen. Anschließend wurden die so hergestellten Homogenate bis zum Gebrauch bei – 80 °C aufbewahrt.

4.8 Toxikologische Methoden

4.8.1 Cytotoxizität

4.8.1.1 MTT Assay

Zur Messung der Cytotoxizität wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 5.000 V79-Zellen pro einzelne Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in 100 μ L DMEM-Komplettmedium ausgesät und 24 h bebrütet. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen pro Konzentration der jeweiligen Substanz in 100 μ L DMEM 24-72 h in 8 wells inkubiert, das entspricht einer Spalte der Mikrotiterplatte. Die finale DMSO-Konzentration betrug in sämtlichen Inkubationsansätzen 1%. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 1% DMSO inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das stark cytotoxische MNNG im Konzentrationsbereich 0,05 bis 1000 μ M für 2 h mit den Zellen inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der verschiedenen Inkubationsansätze auf mögliche Präzipitatbildungen bei 200facher Vergrößerung. Anschließend wurde das Inkubationsmedium unter wiederholtem Abschlagen aus den 96-Loch-Mikrotiterplatten möglichst weitgehend entfernt, mit PBS gewaschen und 100 μ L MTT-Lösung in jede Einzelkavität pipettiert. Nach ca. 2-stündiger Inkubationsdauer bei 37 °C und 7% CO₂ wurde die überständige MTT-Lösung abgeschlagen, pro Kavität 100 μ L DMSO auf die Zellen gegeben. Dies führte zur Freisetzung des durch metabolische Umsetzung gebildeten Formazans. Schließlich erfolgte die spektralphotometrische Vermessung der Formazanlösung bei 570 nm mittels Multiscan Ascent.

Für die pro Substanz-Konzentration erhaltenen OD₅₇₀-Werte wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Eine Normierung aller OD₅₇₀-Werte erfolgte über die Ermittlung des prozentualen Anteils der Mittelwerte der Substanz-Inkubationen, im Verhältnis zu denjenigen der mitgeführten Negativkontrollen.

4.8.2 Genotoxizität

4.8.2.1 Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-(HPRT)-Test zur Erfassung der Mutagenität

Für jede Konzentration der jeweiligen Testsubstanz wurden zwei Gewebekulturschalen mit 600.000 Zellen in DMEM angesetzt. Als Positivkontrolle wurden parentale V79-Zellen mit MNNG (2, 5 und 10 μ g/mL) in Komplettmedium mit 0,01% DMSO inkubiert. Mit 1% DMSO in Komplettmedium inkubierte V79-Zellen dienten als Negativkontrolle. Bei der

Festlegung des Konzentrationsbereiches der zu testenden Substanz war zu beachten, dass bis zu der höchsten Konzentration keine signifikante Cytotoxizität auftreten sollte. Folglich wurde auf der Basis des zuvor durchgeführten MTT-Tests diejenige als höchste Konzentration festgesetzt, bei welcher alle hier getesteten V79-Zellen noch mindestens 80% Vitalität aufwiesen. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit den substanzhaltigen Medien 24-72 h (MNNG: 2 h) inkubiert. Daraufhin wurden die Platten mit PBS gespült und 48 h bebrütet. Danach erfolgte eine Zellzahlbestimmung, woraufhin pro Ansatz $1,25 \times 10^6$ Zellen weiterkultiviert wurden. Zur Selektion der Mutanten wurden die Zellen nach 72 h nochmals ausgezählt, pro Ansatz drei Platten mit 400.000 Zellen beimpft und in Thioguanin-haltigem Medium weiter kultiviert. Parallel wurden pro Ansatz weitere drei 90 mm Gewebekulturschalen zur Kontrolle der *Plating Efficiency* mit 250 Zellen in 12 mL Komplett-Medium beschickt. Sobald die Zellkolonien auf den *Plating Efficiency*- bzw. Selektionsplatten eine Größe von ca. 0,2-2 mm im Durchmesser erreicht hatten, wurden diese fixiert, gefärbt und ausgezählt. Die Fixierung der Zellkolonien erfolgte nach Entfernen des Mediums durch Spülen der Gewebekulturschalen mit 0,9%iger NaCl-Lösung und darauf folgender 10 min Inkubation mit Methanol-Eisessig (3:1). Anschließend wurden die so behandelten Zellen mit Kristallviolett-Lösung gefärbt, mit Leitungswasser gespült und luftgetrocknet. Die Auszählung der Zellkolonien erfolgte per Hand. Zur Bestimmung der Mutantenhäufigkeit pro 10^6 Zellen wurden zunächst die Mittelwerte aus den Kolonienzahlen der Selektionsplatten berechnet und die so ermittelte Anzahl an Mutanten mit dem entsprechenden Korrekturfaktor aus den *Plating Efficiency*-Platten multipliziert. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den beiden voneinander unabhängigen Ansätzen für die jeweilige Konzentration der eingesetzten Substanz ermittelt.

4.8.2.2 Einzelzell-Mikroelektrophorese-Assay (Comet Assay) zur Erfassung genotoxischer Effekte

Der Comet Assay wurde in Anlehnung an die ursprüngliche Version nach Singh et al. [128] und nach Tice et al. [138] mit methodischen Modifikationen durchgeführt.

4.8.2.2.1 Inkubation der Zellen

Für jede Konzentration wurden 100.000 Zellen in 6-well Platten mit den Testsubstanzen in 3 mL DMEM inkubiert. Mit MNNG (2, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelte V79P-Zellen dienten als Positivkontrolle, als Lösungsmittel diente Komplettmedium mit 0,01% DMSO. Für die Negativkontrolle wurden V79-Zellen in Komplettmedium mit DMSO entsprechend der maxi-

mal für die jeweilige Testsubstanz verwendeten Konzentration inkubiert. Bei der Festlegung des Konzentrationsbereiches der zu testenden Substanz war zu beachten, dass bis zu der höchsten Konzentration keine signifikante Cytotoxizität auftreten sollte. Nach 24 h Vorinkubation wurden die Zellen mit den substanzhaltigen Medien 24-72 h (MNNG: 2 h) behandelt. Anschließend erfolgte eine zusätzliche Vitalitätsbestimmung der Einzelzellen mit dem Trypanblau-Ausschlusstest. Dabei wurden 50 μL der Zellsuspension mit 450 μl Trypanblau gemischt und davon ein Tropfen auf einer Neubauer-Zählkammer verteilt. Unter 400facher Vergrößerung erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie des prozentualen Anteils der nicht vitalen, blau angefärbten Zellen.

4.8.2.2.2 Herstellen der Präparate

Es wurden glatte Objektträger mit Mattrand an Ober- und Unterkante verwendet, auf die eine Grundsicht aus 85 μL Agarose (0,5% in PBS) aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt wurde. Die Objektträger wurden dann bei Raumtemperatur waagrecht zum Trocknen der Agarose gelagert. War die Agarose durchgetrocknet, konnten die Objektträger gestapelt und über Monate bis zu ihrer Verwendung gelagert werden. Das Deckglas wurde zum Auftragen der Zellsuspension vorsichtig abgezogen. Von der Zellsuspension wurden 25 μL in 75 μL Low Melting Agarose (0,7% in PBS) aufgenommen, auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt. Zum Erhärten der Agarose wurden die Objektträger dann ca. 5 min bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurde das Deckglas wieder entfernt, eine Deckschicht aus 85 μL Low Melting Agarose aufgetragen und eingedeckt. Nach abermaligem Erhärten dieser Deckschicht wurde das Deckglas entfernt und die Präparate zur Lyse für mindestens eine Stunde bei 4° C in kalte Lyselösung gestellt. Das Aufbewahren der Präparate in der Lyselösung ist für mehrere Tage möglich.

4.8.2.2.3 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt. Die Präparate wurden dann für die Alkalidenaturierung mit dem Alkali-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Dauer der Denaturierung betrug 30 Minuten. Die Elektrophorese erfolgte mit dem gleichen Puffer für 30 min bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA. Während der Denaturierung und Elektrophorese wurde direkter Lichteinfall vermieden.

4.8.2.2.4 Neutralisierung und Anfärbung der DNA

Nach der Elektrophorese wurden die Präparate aus der Kammer genommen, horizontal auf Abtropfständer gelegt und dreimal für jeweils 5 Minuten mit Neutralisierungspuffer (0,4 M Tris, pH 7,5) überschichtet. Nach Trocknung der Objektträger erfolgte die Auswertung der Präparate. Hierfür wurden zur Anfärbung der DNA 50 µL Ethidiumbromid (20 µg/mL) auf die Objektträger pipettiert, diese mit einem Deckglas eingedeckt und in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

4.8.2.2.5 Mikroskopie und Auswertung

Die Auswertung erfolgte bei 200facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter: 515-560 nm; Sperrfilter: 590 nm). Pro Objektträger wurden 50 Zellen zufällig ausgewertet. Zellen an den Randbereichen der Objektträger wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da sie häufig Schäden aufwiesen, die wahrscheinlich auf mechanische Einflüsse zurückzuführen sind. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, deren Zellkern eine runde Form aufwies. Mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems, das über eine CCD-Kamera an das Mikroskop angeschlossen ist, können verschiedene Parameter bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde das *Tailmoment* als Auswerteparameter verwendet. Das *Tailmoment* wird berechnet als Produkt aus Fluoreszenzintensität der aus dem Kern gewanderten DNA und der Wanderungslänge.

4.8.2.3 ³²P-Postlabeling Verfahren zum Nachweis von DNA-Addukten

Der ³²P-Postlabeling Assay wurde mit Butanol-Extraktion zur Anreicherung nach den von Gupta und Earley [136] standardisierten Verfahren durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der DNA enzymatisch zu Nukleosid-3'-Phosphaten verdaut, angereichert und schließlich durch T4-Polynukleotid-Kinase mit 200 µCi [γ -³²P]-ATP je Probe radioaktiv markiert. Die anschließende dünnschichtchromatographische Trennung der Addukte erfolgte auf PEI-Cellulose unter Standardbedingungen.

4.8.2.3.1 Ernte der Zellen

Zu Beginn einer Versuchsreihe wurden jeweils 8×10^5 Zellen auf 140/16 mm Gewebekultur- oder Petrischalen in 20 mL Medium für 24 h in Kultur gehalten. Zu diesen Ansätzen wurden dann die Substanzen in DMSO gelöst gegeben und weitere 24-72 h inkubiert.

Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen zur vollständigen Entfernung von Medium und Testsubstanz zweimal mit jeweils 5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem *Rubber Policeman* abgeschabt und in 3 mL PBS aufgenommen. Durch Zentrifugation bei 800 rpm 2000 U/min wurde ein Pellet erhalten, welches bis zur DNA-Isolierung bei -80 °C gelagert wurde.

4.8.2.3.2 Isolierung von DNA aus V79-Zellen

Die Zellen (0,3 g) wurden in 3 mL 1% SDS/1 mM EDTA und 1 M Tris/HCl pH 7,4 mit dem Ultraturrax 1 min homogenisiert und mit Ultraschall behandelt. Das Homogenat wurde für 45 min bei 37 °C mit 60 µL RNAse A und 10 µL RNAse T1 inkubiert. Anschließend wurde mit 30 µL Proteinase K 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion zunächst mit 3 mL AquaPhenol, dann mit 3 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und mit 3 mL Chloroform/Isoamylalkohol (96/4 v/v) wurde die DNA durch Zugabe von 300 µL 5 M NaCl und 3 mL eisgekühltem Ethanol gefällt. Nach 4 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm wurde das Pellet dreimal mit 70% Ethanol gewaschen und in H₂O gelöst.

4.8.2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch in einem Spektralphotometer bestimmt. In einem Wellenbereich von 200 bis 300 nm sind drei Wellenlängen von Bedeutung:

230 nm: Absorptionsbereich von Salzen

260 nm: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren

280 nm: Absorptionsmaximum von Proteinen

Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ergibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Das Verhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 230 nm ermöglicht ein Abschätzen des Salzgehaltes der Probe.

Unter der Annahme einer optischen Dichte von 20 für eine Lösung von exakt 1 mg DNA/mL ergibt sich folgende Berechnung der DNA-Konzentration:

$$DNA \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{OD \left(\frac{260}{20} \right) \times (1000 + Aliquotvolumen)}{Aliquotvolumen}$$

4.8.2.3.4 DNA-Hydrolyse

Die Lösung mit 10 µg DNA wurde im Vacuum Concentrator zur Trockne gebracht, anschließend mit 0,6 U Micrococcus Nuclease und 0,1 U Phosphodiesterase in einem Volumen von 25 µL Nukleotidpuffer für 3 h bei 37 °C hydrolysiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser (Ampuwa) auf ein Totalvolumen von 50 µL gebracht.

Zur Bestimmung der natürlichen Nukleotide wurden 2,5 µL des Hydrolysats in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 17,5 µL Ampuwa verdünnt (= Verdünnung 1). 10 µL Verdünnung 1 wurden ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1490 µL Wasser verdünnt (= Verdünnung 2) und zur Kontrolle der Hydrolyse bei -20 °C aufbewahrt.

4.8.2.3.5 DNA-Addukt Anreicherung: Butanol-Extraktion

Das DNA-Hydrolysat wurde mit 25 µL Tetrabutylammoniumchlorid (TBACl) und 25 µL Ammoniumformiat (pH 3,5) versetzt und mit Wasser (Ampuwa) auf ein Volumen von 250 µL gebracht, um eine Endkonzentration von 1 mM TBACl und 10 mM Ammoniumformiat zu erhalten. Die Anreicherung der Addukte erfolgte durch zweimalige Extraktion mit 250 µL Butanol (doppelt destilliert, Wasser gesättigt) [136,139]. Die vereinigten Butanol-Extrakte wurden dreimal mit 450 µL Wasser (Butanol gesättigt) gewaschen, anschließend mit 2 µL 200 mM Tris/HCl (pH 9,5) versetzt und in einem Vacuum Concentrator zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 15 µL Wasser (Ampuwa) rekonstituiert.

4.8.2.3.6 ³²P-Postlabeling

7,5 µL angereichertes DNA-Hydrolysat wurden mit 2,5 µL Hotmix versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden 2 µL Apyrase zugegeben und nochmals 30 min stehengelassen.

4.8.2.3.7 Chromatographie

Die PEI-Folien wurden zunächst für 4 h bei 70 °C thermisch behandelt, anschließend erst in 500 mL Methanol, dann für 5 min in H₂O dest. gewaschen und getrocknet. Auf eine vorbehandelte PEI-Platte wurde der gesamte Ansatz aufgetragen und in 3 Dimensionen (D1-D3)

chromatographiert (Abb. 15). Die Platten wurden nach jedem Lauf in Millipore-Wasser gewaschen und mit einem Fön getrocknet.

- D1: An die untere Kante der PEI-Folie wird ein Filterpapier angeheftet. 16 μ L Probe werden aufgetragen und über Nacht auf das Filterpapier laufen gelassen. Anschließend wird das Filterpapier abgeschnitten und entsorgt (enthält ca. 99% der eingesetzten Radioaktivität). Das Chromatogramm wird gewaschen und trocken gefönt.
- D2: Die PEI-Folie 2 cm wird zuerst mit Millipore-Wasser chromatographiert. Anschließend wird das Laufmittel bis an den oberen Rand der PEI-Folie laufen gelassen. Das Chromatogramm wird gewaschen und trocken gefönt.
- D3: Die PEI-Folie wird wieder zuerst mit Millipore-Wasser chromatographiert, aber nur ca. 2 cm. Anschließend wird das Laufmittel bis an den oberen Rand der PEI-Folie laufen gelassen. Das Chromatogramm wird gewaschen und trocken gefönt..
- D4: Die PEI-Folie wird über Nacht in die gleiche Richtung wie D3 chromatographiert, wobei an die obere Kante ein Filterpapier angeheftet wird. Anschließend wird das Filterpapier abgeschnitten und entsorgt.

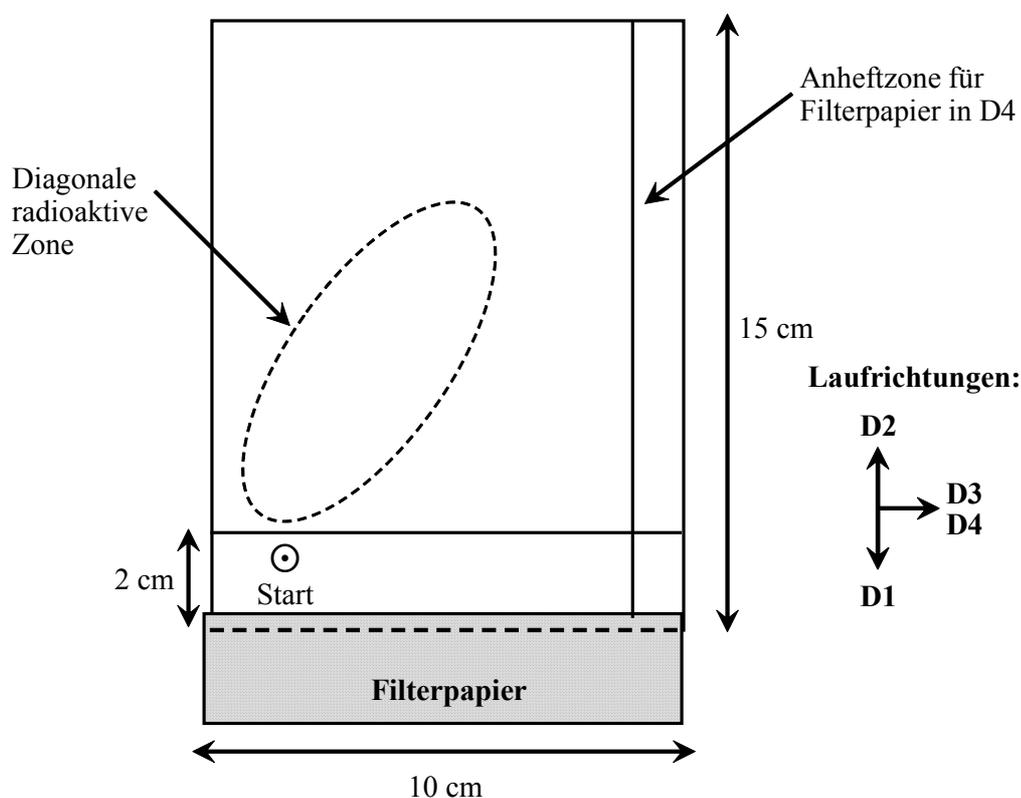


Abb. 15: Laufrichtungen für die Dünnschichtchromatographie von DNA-Addukten auf PEI-Platten

4.8.2.3.8 Kontrolle der Hydrolyse

6 μL Verdünnung 2 des Hydrolysates wurden mit 3 μL Hotmix versetzt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 91 μL 100 mM Tris/1 mM EDTA zugegeben. 5 μl dieser Proben wurden auf PEI-Folien aufgetragen und die normalen Nukleotide sowie unverbrauchtes ATP durch Chromatographieren bis an den oberen Rand der Folie mit 250 mM Ammoniumsulfat/50 mM NaH_2PO_4 getrennt.

4.8.2.3.9 Quantifizierung der Chromatogramme

Die PhosphorImage Platten wurden mit den getrockneten Chromatogrammen zusammen mit Aktivitätsstandards exponiert.

Die Radioaktivitätsmenge der natürlichen Nukleotide sowie der Adduktspots wurde mit dem Fuji BAS Bio-Imaging Analyzer und dem Software-Programm Tina 2,07c bestimmt. Unter Berücksichtigung des Zerfalles von ^{32}P mit der spezifischen Radioaktivität (sA) des ATP während der Labeling-Reaktion und der Labeling Efficiency (LE) wurde der RAL (Relativer Addukt Level) nach folgender Formel berechnet [139,140]:

$$RAL = \frac{cpm \text{ Addukte}}{(cpm \text{ dNTP} + cpm \text{ Addukte})}$$

Aufgrund des vernachlässigbaren Beitrags der cpm in den Addukten zu den cpm der normalen Nukleotide reduziert sich die Formel auf das folgende Verhältnis:

$$RAL = \frac{cpm \text{ Addukte}}{cpm \text{ dNTP}}$$

Wegen der verschiedenen Ausgangsmengen, die für das Labeling der natürlichen bzw. der adduktbeladenen Nukleotide verwendet werden, müssen die auf der PEI-Platte bestimmten Radioaktivitätsmengen, $cpm \text{ dNTP}_{DC}$ und $cpm \text{ Addukte}_{DC}$ folgendermaßen korrigiert werden:

$$cpm \text{ dNTP} = \frac{[cpm \text{ dNTP}_{DC}] \times 100 \times 1200 \times 50}{5 \times 6}$$

(50 = Gesamtvolumen der hydrolysierten DNA; 1200 = Verdünnungsfaktor von Verdünnung 2; 100/6 = Verdünnungsfaktor beim Labeling; 5 = auf die Platte aufgetragenes Aliquot).

$$cpm \text{ Addukte} = \frac{(cpm \text{ Addukte}_{DC}) \times 50 \times 20}{47,5 \times 16}$$

(50 = Gesamtvolumen der hydrolysierten DNA; 47,5 = für die Anreicherung verwendetes Aliquot; 16/20 = auf die Platte aufgetragenes Aliquot).

4.9 Statistik

Zur Berechnung der Ergebnisse wurde das Programm Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.) verwendet.

Soweit nicht anders angegeben sind in den Abbildungen die Mittelwerte (MW) mit den Standardfehlern des Mittelwertes (SEM) dargestellt. In den Tabellen wird jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) angegeben. Um auf Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen zu testen, wird der ANOVA Test mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test bzw. der t-Test verwendet. Die Unterschiede gelten als signifikant falls $p < 0,05$ ist. In den Tabellen sind signifikante Unterschiede durch Fettdruck hervorgehoben.

Um bei den Untersuchungen zu Wechselwirkungen festzustellen, ob der Effekt sich von einem additiven Effekt unterscheidet, wurde zu den addierten Mittelwerten eine kombinierte Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) mit der folgenden Formel aus den beiden SEM der Einzelwerte berechnet:

$$\bar{X}_1 + \bar{X}_2 \pm \sqrt{(S_{\bar{X}_1})^2 + (S_{\bar{X}_2})^2}$$

Mit diesem Wert wurde dann der Messwert für die Kombination mit Hilfe des t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Einzelsubstanzen

5.1.1 4-Aminobiphenyl

5.1.1.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Zur Messung von Vitalität und Wachstum der Zellen wurde der sogenannte MTT-Test verwendet. Dieser Test misst die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen. Der MTT-Test dient in erster Linie dazu, die maximalen Konzentrationen zu bestimmen, die später im Comet- und HPRT-Test eingesetzt werden können. In jedem Versuch werden je untersuchter Konzentration acht Wiederholungen angesetzt. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase als Maß für die Vitalität der Zellen wird im Vergleich zu der lösungsmittel-behandelten Negativkontrolle bestimmt. Dazu wird die Absorption des Mittelwertes der Negativkontrolle gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der übrigen Werte hieran bestimmt. In den Abbildungen wird jeweils der Mittelwert (MW) aus den Einzelversuchen, sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. In den Tabellen wird die Wahrscheinlichkeit (p) von Unterschieden zwischen den Ansätzen angegeben. Um auf Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen zu testen, wird der ANOVA-Test mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test (S-N-K) verwendet.

4-ABP, ein aromatisches Amin, gehört zu den wenigen Substanzen, die als eindeutig krebs-erzeugend für den Menschen eingestuft werden. Die in der Leber durch das CYP1A2 bewerk-stellte N-Hydroxylierung wird als entscheidender Schritt in der Aktivierung zu DNA-bindenden Spezies betrachtet. [44]. Jüngste Befunde zur Toxizität und Kanzerogenität von 4-ABP in *knock-out* Mäusen ohne aktives CYP1A2 haben jedoch Zweifel an der Rolle dieses Enzyms bei der Maus geweckt [87].

Unter Einbeziehung verschiedener Zelllinien sollte daher die Rolle von humanen CYP-Enzy-men bei der Toxifizierung verschiedener aromatischer Amine untersucht werden. In unseren Experimenten zeigte 4-ABP eine geringfügig erhöhte Cytotoxizität in Zellen mit humanem CYP1A1 und CYP1A2 (Abb. 16; Tabelle 1). Die Prüfung auf signifikante Unterschiede bei zwei Konzentrationen ($10^{-6,5}$ und $10^{-4,5}$ M) mit dem ANOVA- und nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test ergab nur bei der höheren Konzentration Signifikanzniveau ($p < 0,01$). Alle Zelllinien zeigen jedoch einen abrupten Abfall des Kurvenverlaufs ab ca. 50 μ M 4-ABP. Dies spricht für keinen wesentlichen Einfluss des Metabolismus auf die Cytotoxizität von 4-ABP.

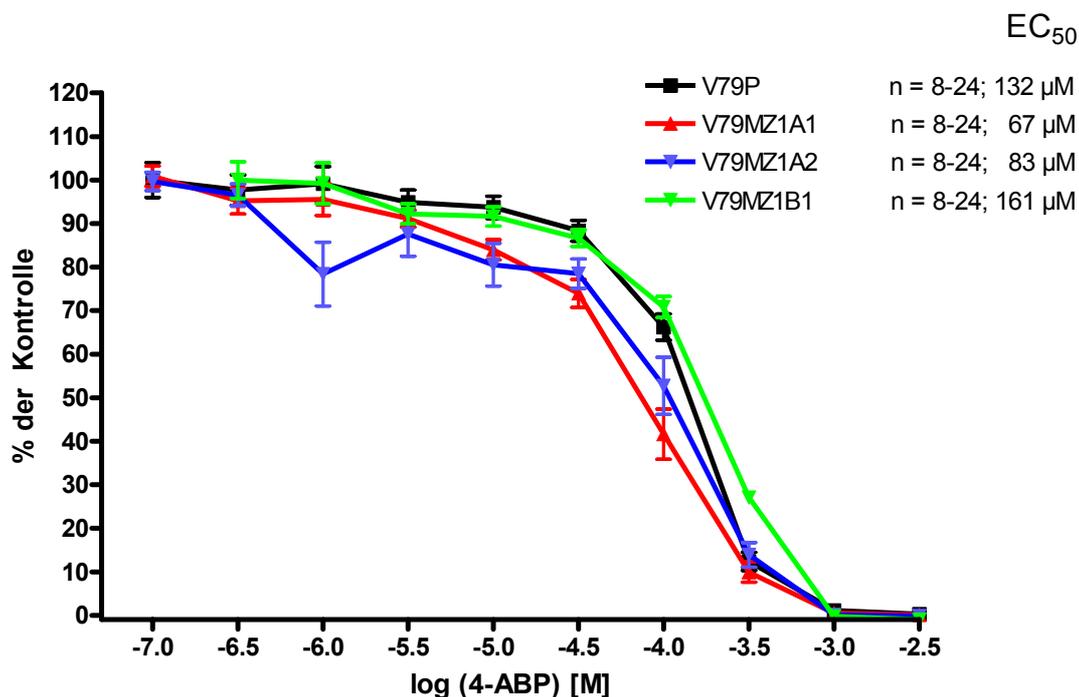


Abb. 16: Cytotoxizität von 4-ABP in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrollen, die nur mit dem Lösungsmittel (0,5% DMSO) inkubiert wurden. Der EC₅₀-Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 3 von einander unabhängigen Messtagen; MW ± SEM.

Tabelle 1: Cytotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 4-ABP.

Test	10 ^{-6,5} M	10 ^{-4,5} M
	p-Werte	
ANOVA	0,8699	0,0027
S-N-K		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05	<0,01
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	<0,01
V79P vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2	>0,05	>0,05
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05
V79MZ1A2 vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05

5.1.1.2 Comet Assay (Genotoxizität)

Der Comet Assay dient dem Nachweis von DNA-Schäden. Um cytotoxische Effekte auszuschließen, wurden nur Konzentrationen eingesetzt, bei denen die Zellen noch mindestens

70% Vitalität (Kontrolle durch Trypanblau-Färbung) zeigen. Die Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten Objektträger, erfolgt mit dem Programm Comet Assay II (Perceptive Instruments) bei 40facher Vergrößerung. Pro Objektträger werden 50 Zellen ausgewertet. Es wird jeweils das Olive Tail Moment (OTM) bestimmt, das sich aus dem Anteil der DNA im Schweif multipliziert mit der mittleren Wegstrecke der DNA berechnet. Dargestellt sind in den Graphen jeweils der Mittelwert (MW) sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus den Einzelversuchen als relative Werte. In den Tabellen wird die Wahrscheinlichkeit (p) von Unterschieden zwischen den Ansätzen angegeben. Um auf Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen zu testen, wird der ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test verwendet. In ersten Untersuchungen zeigte das eindeutig kanzerogene 4-ABP erst bei einer Konzentration ab 0,6 mM einen genotoxischen Effekt. Er ist unabhängig von einer metabolischen Aktivierung, da auch die Zelllinie ohne CYP1A2 einen erhöhten OTM-Wert erreicht (Abb. 17; Tabelle 2). Die OTM-Werte für die Zelllinie, in der zusätzlich zu CYP1A2 noch NAT2*4 koexprimiert ist, liegen immer unterhalb von denen der V79MZ1A2-Zelllinie ohne NAT2*4, bei 0,6 mM auch deutlich unterhalb der Werte für die parentalen Zellen ($p < 0,05$; Tabelle 2). Dies spricht für eine Abschwächung der Genotoxizität von 4-ABP durch die N-Acetylierung. Bei der höchsten Konzentration von 4-ABP (1 mM) geht dieser Schutzeffekt durch NAT2*4 wieder verloren.

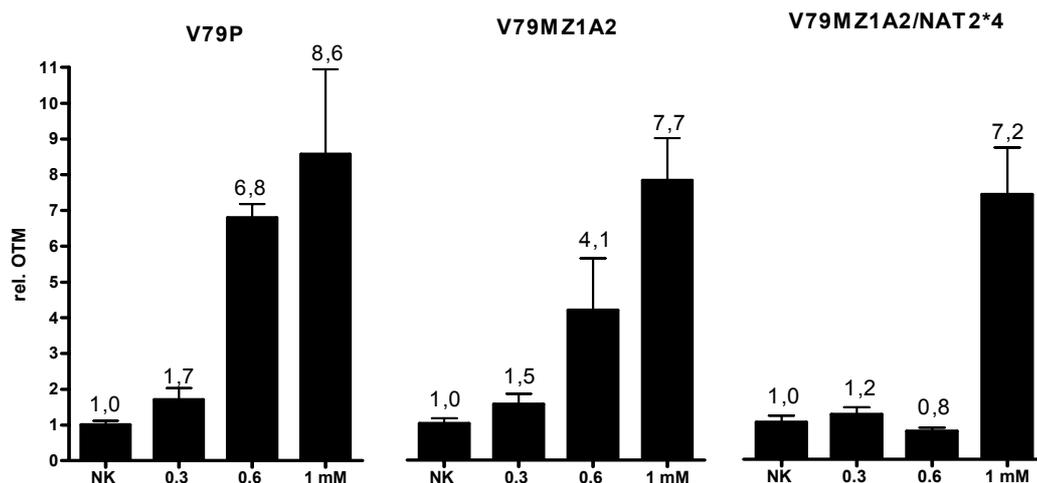


Abb. 17: Genotoxizität von 4-ABP in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relative Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,1%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,23 (n = 3-10); V79MZ1A2: 0,21 (n = 3-14); V79MZ1A2/NAT2*4: 0,20 (n = 3-5); MW \pm SEM.

Tabelle 2: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 0,3 – 1 mM 4-ABP in absoluten Werten.

Test	Abhängigkeit von der Konzentration		
	V79P	V79MZ1A2	V79MZ1A2/ NAT2*4
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S-N-K			
NK vs 0,3	>0,05	>0,05	>0,05
NK vs 0,6	<0,01	<0,01	>0,05
NK vs 1,0 mM	<0,001	<0,001	<0,001
	Abhängigkeit vom Zelltyp		
	0,3	0,6	1,0 mM
ANOVA	<0,0001		
S-N-K			
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	>0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	<0,05	>0,05
V79MZ1A2 vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	>0,05	>0,05

Bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Wechselwirkung mit PAK kam eine geringere Konzentration von nur 3,2 nM 4-ABP zum Einsatz. Überraschender Weise wirkte 4-ABP in diesen Versuchen bereits genotoxisch, wenn auch in geringem Maß. Der Effekt war wiederum nicht von der Expression von humanen CYP abhängig, es bestehen keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Zelllinien (Abb. 18; Tabelle 3).

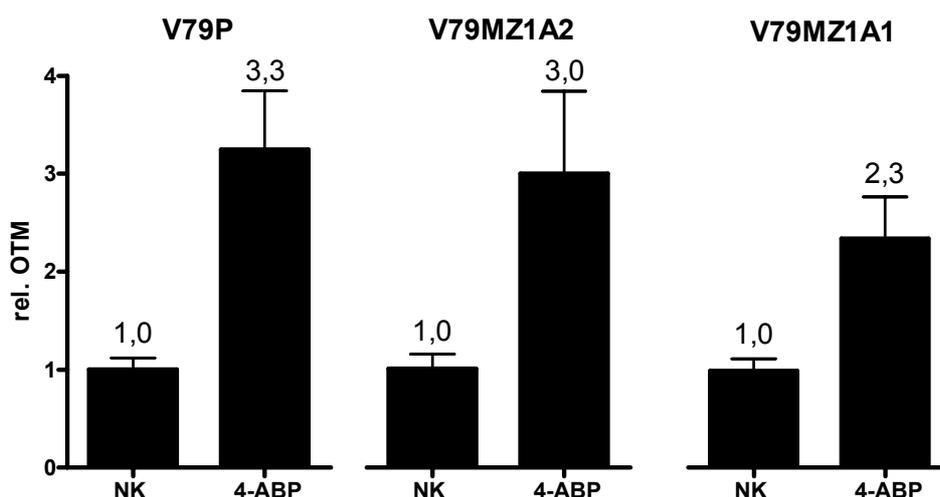


Abb. 18: Genotoxizität von 3,2 nM 4-ABP in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,1%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,23 (n = 3-10); V79MZ1A2: 0,21 (n = 6-14); V79MZ1A1: 0,33 (n = 6-9); MW ± SEM.

Tabelle 3: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 3,2 nM 4-ABP in absoluten Werten.

Test	Abhängigkeit von der Konzentration		
	V79P	V79MZ1A2	V79MZ1A1
t-Test vs NK	<0,0001	0,0030	0,0032
	Abhängigkeit vom Zelltyp		
	3,2 nM		
ANOVA	0,6595		
S-N-K			
V79P vs V79MZ1A2	>0,05		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05		
V79MZ1A2 vs V79MZ1A1	>0,05		

5.1.1.3 HPRT Assay (Mutagenität)

Mit Hilfe des HPRT-Tests lassen sich zum Beispiel Basenpaar- und Frameshiftmutationen und kleinere Deletionen am Hypoxanthinphosphoribosyltransferase-Locus des V79MZ-Genoms nachweisen. Er ermöglicht eine Abschätzung des mutagenen Potenzials. Die Versuche wurden mit V79P, V79MZ1A1 und V79MZ1A2-Zellen durchgeführt.

Das Verfahren konnte erfolgreich etabliert werden. Die Zahl der Spontanmutationen in den Kontrollproben lag unterhalb von 10 Mutanten/10⁶ lebensfähigen Zellen. Bei 3,2 nM 4-ABP, einer Konzentration, im MTT-Test keinerlei Toxizität zeigt, wurde in parentalen V79 Zellen bereits ein deutlicher mutagener Effekt sichtbar (Abb. 19; Tabelle 4: p = 0,0159). Die mehr als zehnfache Zunahme mutierter Zellen wurde dagegen bei den mit CYP1A2 oder CYP1A1 transfizierten Zellen nicht gesehen. Dies spricht für einen Schutzeffekt durch Metabolisierung von 4-ABP, der in dieser niedrigen Konzentration zum Tragen kommt.

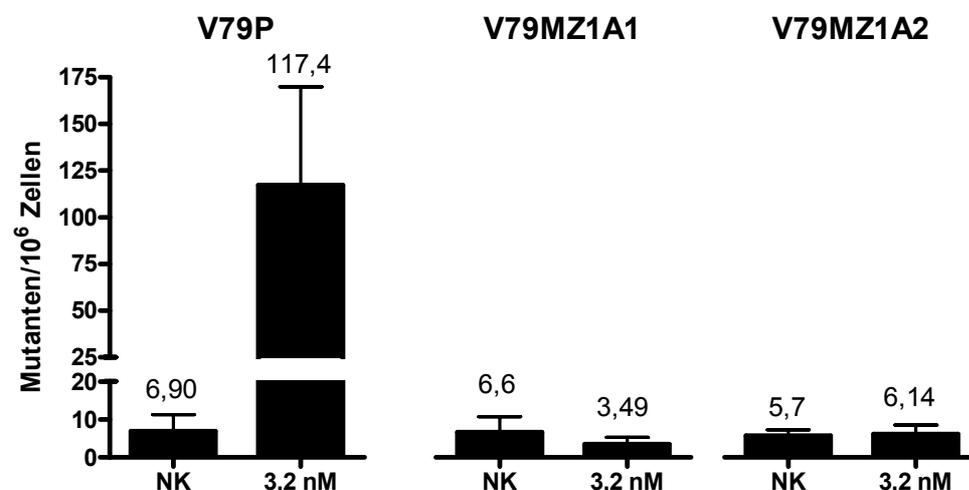


Abb. 19: Mutagener Effekt des 4-ABP in V79MZ Zelllinien im HPRT-Test. Die Zellen wurden 72 h mit 4-ABP inkubiert. Die Kontrolle wurde mit 0,5% DMSO behandelt. Gezeigt sind die Ergebnisse von mindestens 2 von einander unabhängigen Messtagen; V79P: n = 3-6; V79MZ1A1: n = 8-10; V79MZ1A2: n = 3; MW ± SEM.

Tabelle 4: Mutagenität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 3,2 nM 4-ABP.

Test	Abhängigkeit von der Konzentration		
	V79P	V79MZ1A2	V79MZ1A1
t-Test vs NK	0,0159	0,8898	0,5390
	Abhängigkeit vom Zelltyp		
	3,2 nM		
ANOVA	0,0349		
S-N-K			
V79P vs V79MZ1A2	<0,05		
V79P vs V79MZ1A1	<0,05		
V79MZ1A2 vs V79MZ1A1	>0,05		

5.1.2 o-Toluidin

5.1.2.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

o-Toluidin ist ein monocyclisches aromatisches Amin mit starker kanzerogener Wirkung für die Blase. Die Rolle von Humanenzymen in der Aktivierung diesesamins ist weitgehend unbekannt. Die EC_{50} -Werte für die verschiedenen Zelllinien liegen zwischen 104 μM für V79MZ1B1 und 986 μM für V79MZ1A2 (Abb. 20). Die geringfügigen Unterschiede in den ansonsten annähernd parallel verlaufenden Kurven sprechen nicht für eine spezifische Rolle der exprimierten Cytochrome für die Cytotoxizität von o-Toluidin (Tabelle 5).

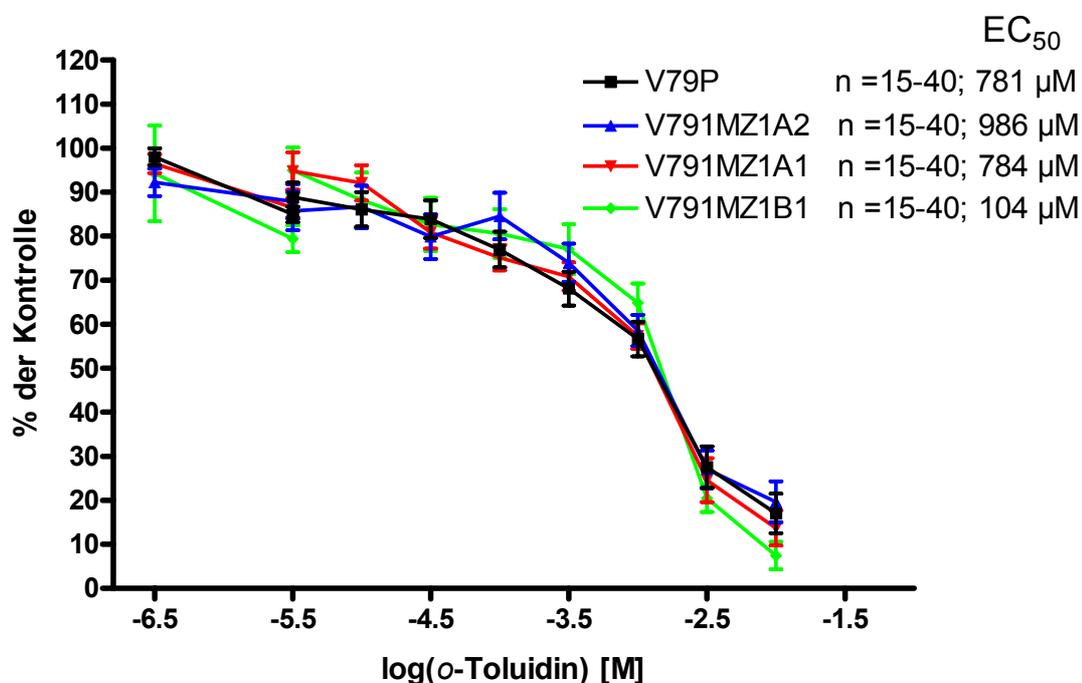


Abb. 20: Cytotoxizität von o-Toluidin in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrollen, die nur mit dem Lösungsmittel (0,5% DMSO) inkubiert wurden. Der EC_{50} -Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 5 von einander unabhängigen Messtagen; MW \pm SEM.

Tabelle 5: Cytotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit *o*-Toluidin.

Test	10 ^{-5,5} M	10 ^{-3,5} M
	p-Werte	
ANOVA	0,8310	0,1430
S-N-K		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2	>0,05	>0,05
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05
V79MZ1A2 vs V79MZ1B1	>0,05	>0,05

5.1.2.2 Comet Assay (Genotoxizität)

In der niedrigsten Konzentration von 3,2 nM führte *o*-Tol zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Migration in allen getesteten Zelllinien (Abb. 21; Tabelle 6). Der Effekt ist unabhängig vom Metabolismus, da innerhalb der Zelllinien keine Unterschiede bestehen. Bei höheren Konzentrationen von 0,1 bis 2 mM *o*-Tol, die im MTT-Test bereits die Vitalität der Zellen herabsetzen, erhöhen sich die OTM-Werte nicht weiter (Abb. 22; Tabelle 7). Die schwache konzentrationsabhängige Steigerung der Genotoxizität fällt bei den CYP1A1- und CYP1A2-exprimierenden Zellen etwas stärker aus als bei den parental Zellen, erreicht aber nur bei 1 mM *o*-Tol in den CYP1A2-exprimierenden Zellen Signifikanz ($p < 0,05$). Bei der koexprimierenden Zelllinie V79MZ1A2/NAT2*4 schwächt sich der Effekt auf Kontrollwerte ab.

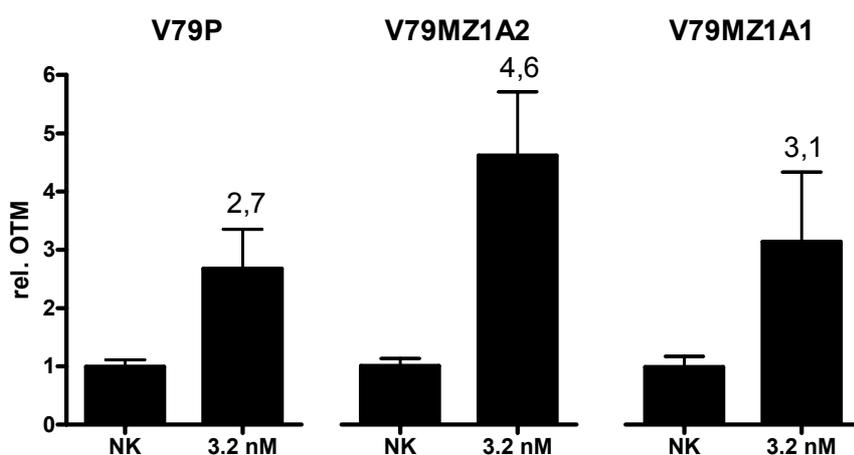


Abb. 21: Genotoxizität von *o*-Tol in V79-Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,4%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,26 (n = 4-12); V79MZ1A2: 0,17 (n = 3-15); V79MZ1A1: 0,27 (n = 4-8); MW \pm SEM.

Tabelle 6: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 3,2 nM o-Tol in absoluten Werten.

Test	Abhängigkeit von der Konzentration		
	V79P	V79MZ1A2	V79MZ1A1
t-Test 3,2 nM vs NK	0,0013	<0,0001	0,0288
	Abhängigkeit vom Zelltyp (3,2 nM)		
ANOVA	0,4372		
S-N-K			
V79P vs V79MZ1A2	>0,05		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05		
V79MZ1A2 vs V79MZ1A1	>0,05		

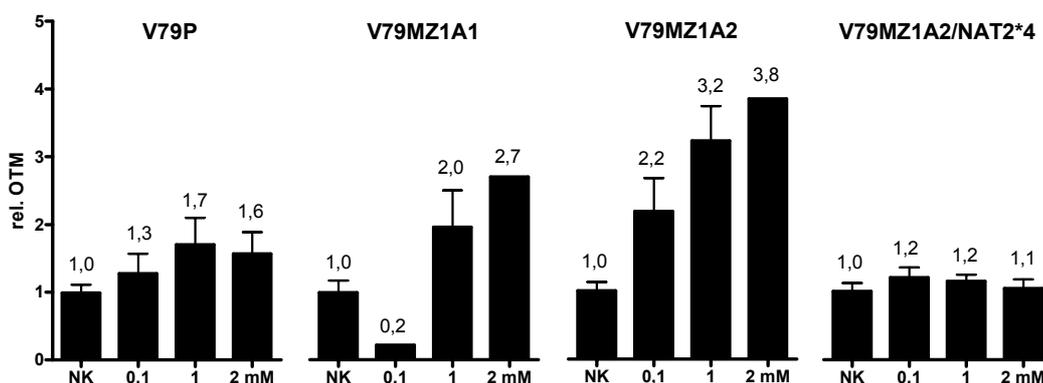


Abb. 22: Genotoxizität von o-Tol in V79-Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,4%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,26 (n = 4-12); V79MZ1A1: 0,27 (n = 2-8); V79MZ1A2: 0,17 (n = 9-15; 2 mM: n = 1); V79MZ1A2/NAT2*4: 0,22 (n = 3-5); MW ± SEM.

Tabelle 7: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 0,1 – 2 mM o-Tol in absoluten Werten (n.a. = nicht analysiert bei n < 3).

Test	Abhängigkeit von der Konzentration			
	V79P	V79MZ1A1	V79MZ1A2	V79MZ1A2/NAT2*4
ANOVA	0,0275	0,0530	0,0002	0,7042
S-N-K				
NK vs 0,1	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
NK vs 1,0	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
NK vs 2,0 mM	>0,05	>0,05	n.a.	>0,05
	Abhängigkeit vom Zelltyp			
	0,1	1,0	2,0 mM	
ANOVA	0,2938			
S-N-K				
V79P vs V79MZ1A1	n.a.	>0,05	n.a.	
V79P vs V79MZ1A2	n.a.	>0,05	n.a.	
V79P vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	>0,05	>0,05	
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2	n.a.	>0,05	n.a.	
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2/NAT2*4	n.a.	>0,05	n.a.	
V79MZ1A2 vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	>0,05	n.a.	

Bei noch höheren, eindeutig cytotoxischen Konzentrationen von 5 bis 16 mM kann der von Hartmann et al. [141] gezeigte genotoxische Effekt von *o*-Tol bestätigt werden (Abb. 23). Es wurden nur je zwei Versuche pro Konzentration durchgeführt, weshalb eine statistische Auswertung keinen Sinn macht. In der Tendenz zeigt sich eine dosisabhängige Steigerung der Genotoxizität, die bei den CYP1A1- und CYP1B1-exprimierenden Zellen stärker ausfällt.

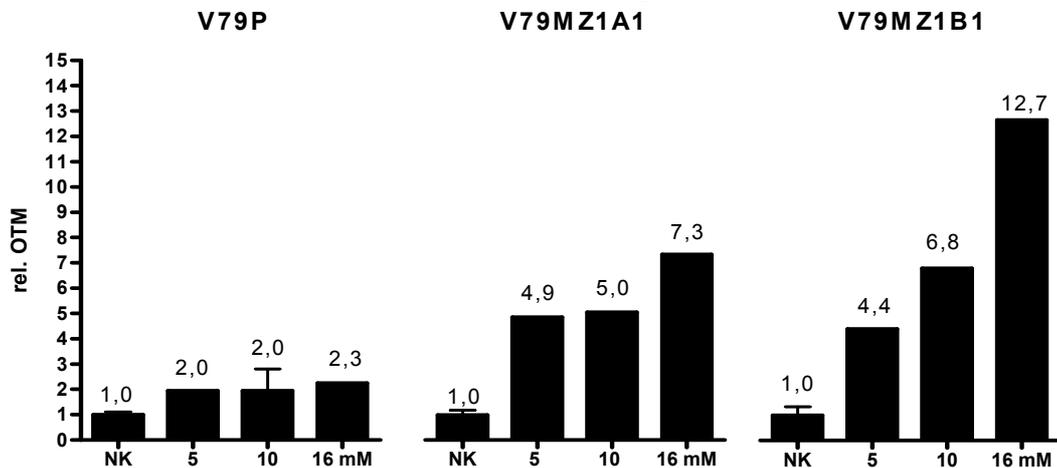


Abb. 23: Genotoxizität von *o*-Tol in V79-Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,4%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,26 (n = 2-12); V79MZ1A1: 0,27 (n = 2-8); V79MZ1B1: 0,25 (n = 2-4); MW ± SEM.

5.1.2.3 HPRT Assay (Mutagenität)

Auch mit *o*-Tol konnte an parental Zellen mit dem HPRT Assay bereits bei 3,2 nM ein Anstieg der Anzahl mutierter Zellen gesehen werden, der aber nicht Signifikanzniveau erreicht (Abb. 24). Mit den CYP1A1- und CYP1A2-exprimierenden Zellen wurden für eine statistische Bewertung zu wenige Versuche durchgeführt. Die teilweise bis vollständige Unterdrückung der Mutagenität spricht, wie bei 4-ABP, für einen möglichen Schutz durch Metabolismus von *o*-Tol.

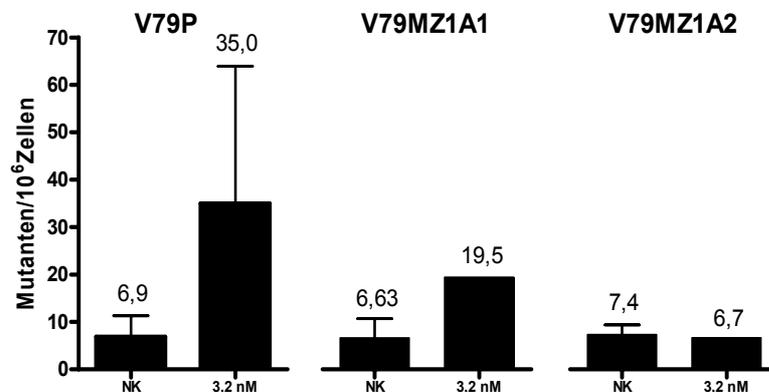


Abb. 24: Mutagener Effekt des *o*-Tol in V79MZ Zelllinien. Die Zellen wurden 72 h mit *o*-Tol inkubiert. Die Kontrolle wurde mit 0,03% DMSO behandelt. Gezeigt sind Ergebnisse von mindestens 2 von einander unabhängigen Messtagen; V79P: n = 4-6; V79MZ1A1: n = 2-5; V79MZ1A2: n = 2-4; MW ± SEM.

Erst bei höheren Konzentrationen wird in den V79MZ1A2 Zellen ein mutagener Effekt des *o*-Tol im HPRT Assay sichtbar, der aber nicht Signifikanz erreicht (Abb. 25; Tabelle 8). Zu erkennen ist ein konzentrationshängiger Anstieg der Mutantenzahl auf 12 bis 23 Mutanten pro 10^6 Zellen nach 72 h Inkubation mit 0,1 bzw. 1 mM *o*-Tol.

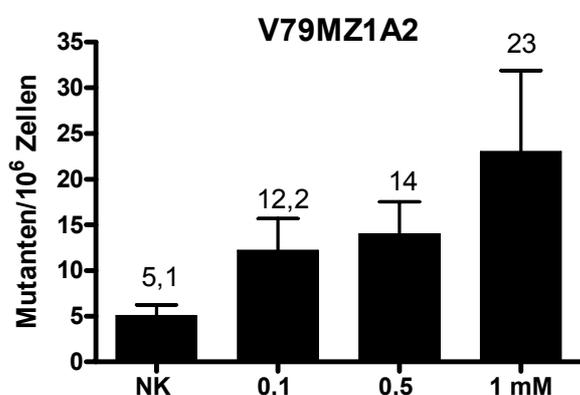


Tabelle 8: Mutagenität in V79MZ1A2-Zellen nach 72 h Inkubation mit 0,1 – 1 mM *o*-Tol.

Test	p-Wert
ANOVA	0,1812
S-N-K	
NK vs 0,1 mM	>0,05
NK vs 0,5 mM	>0,05
NK vs 1,0 mM	>0,05

Abb. 25: Mutagener Effekt des *o*-Tol in V79MZ1A2-Zellen im HPRT-Test. Die Zellen wurden 72h mit *o*-Tol inkubiert. Die Kontrolle wurde mit 0,05% DMSO behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 2 von einander unabhängigen Messtagen; n = 3; MW ± SEM.

5.1.3 *m*-Toluidin

5.1.3.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Das nicht kanzerogene *m*-Toluidin wie die anderen Toluidin-Isomere Hämoglobinaddukte [108], aus deren Höhe sich auf eine nicht unerhebliche Belastung der Umwelt mit *m*-Tol schließen lässt. Der Kurvenverlauf der Cytotoxizität zeigt keinerlei Unterschiede zwischen parentalen Zellen und solchen mit humanen CYP1A1, CYP1A2 oder CYP1B1 (Abb. 26).

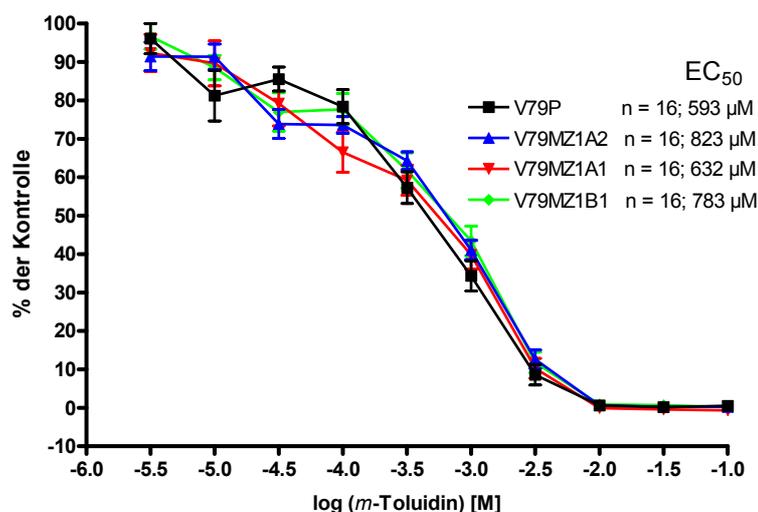


Abb. 26: Cytotoxizität von *m*-Tol in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle, die nur mit dem Lösungsmittel (0,3% DMSO) inkubiert wurde. Der EC₅₀-Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 2 von einander unabhängigen Messtagen; MW ± SEM.

5.1.3.2 Genotoxizität (Comet Assay)

m-Tol ist im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 mM für die parentale Zelllinie nicht genotoxisch. In den CYP1A2-exprimierenden Zellen wirkt *m*-Tol schwach genotoxisch, jedoch ohne Konzentrationsabhängigkeit. Die Unterschiede sind bei 1 mM nur gegenüber den parentalen Zellen, nicht aber gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikant (Abb. 27; Tabelle 9). Bei den CYP1A2/NAT2*4-exprimierenden Zellen wird der genotoxische Effekt durch N-Acetylierung wieder abgeschwächt, bei 1,0 mM ebenfalls signifikant gegenüber den CYP1A2-exprimierenden Zellen.

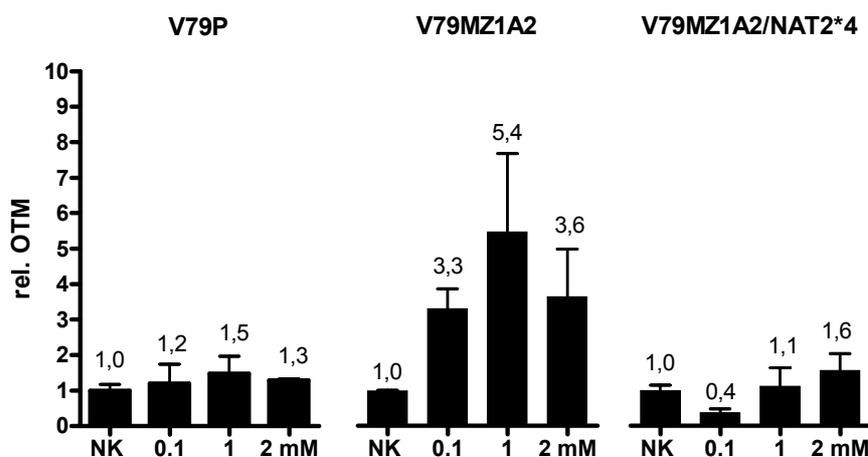


Abb. 27: Genotoxizität von *m*-Tol in V79-Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,4%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,24 (n = 3-5); V79MZ1A2: 0,17 (n = 3); V79MZ1A2/NAT2*4: 0,19 (n = 3-7); MW ± SEM.

Tabelle 9: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 0,1 – 2 mM *m*-Tol in absoluten Werten.

Test	Abhängigkeit von der Konzentration		
	V79P	V79MZ1A2	V79MZ1A2/ NAT2*4
ANOVA	0,8796	0,6092	0,3773
S-N-K			
NK vs 0,1	>0,05	>0,05	>0,05
NK vs 1,0	>0,05	>0,05	>0,05
NK vs 2,0 mM	>0,05	>0,05	>0,05
	Abhängigkeit vom Zelltyp		
	0,1	1,0	2,0 mM
ANOVA	0,0126		
S-N-K			
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	<0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	>0,05	>0,05
V79MZ1A2 vs V79MZ1A2/NAT2*4	>0,05	<0,05	>0,05

5.1.4 Pyren

5.1.4.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Pyren ist in Gemischen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe quantitativ sehr stark vertreten und wird aus diesem Grund als Leitsubstanz im Biomonitoring verwendet. Pyren zeigt, im Gegensatz zu Benzo[a]pyren, trotz großer Ähnlichkeit der Molekülgestalt keine Mutagenität im Ames-Test [80]. Eine fehlende Metabolisierung durch den Organismus ist jedoch nicht die Ursache für diesen Unterschied, denn bereits Untersuchungen aus den 1950er Jahren belegen eine Metabolisierung von Pyren zu Pyren-1-Hydroxid und Pyren-1-Glucuronid in der Leber von Mäusen nach intravenöser Injektion [81].

Für den MTT-Test wurde ein Konzentrationsbereich von 0,01 bis 100 μM ausgewählt. Wie bei den aromatischen Aminen verlaufen die Kurven auch beim Pyren bei den verschiedenen Zelllinien parallel. Oberhalb von 1 μM werden cytotoxische Effekte sichtbar (Abb. 28). Die beispielhaft bei 10^{-7} und 10^{-5} M getesteten Werte ergeben signifikante Unterschiede zwischen V79MZ1B1 Zellen und parentalen wie auch V79MZ1A1 Zellen (Tabelle 10). Die Ursache für die geringe Toxizität bei den CYP1B1-exprimierenden Zellen auch bei niedrigeren Konzentrationen ist unbekannt, sie hat jedoch keinen Einfluss auf den EC_{50} -Wert.

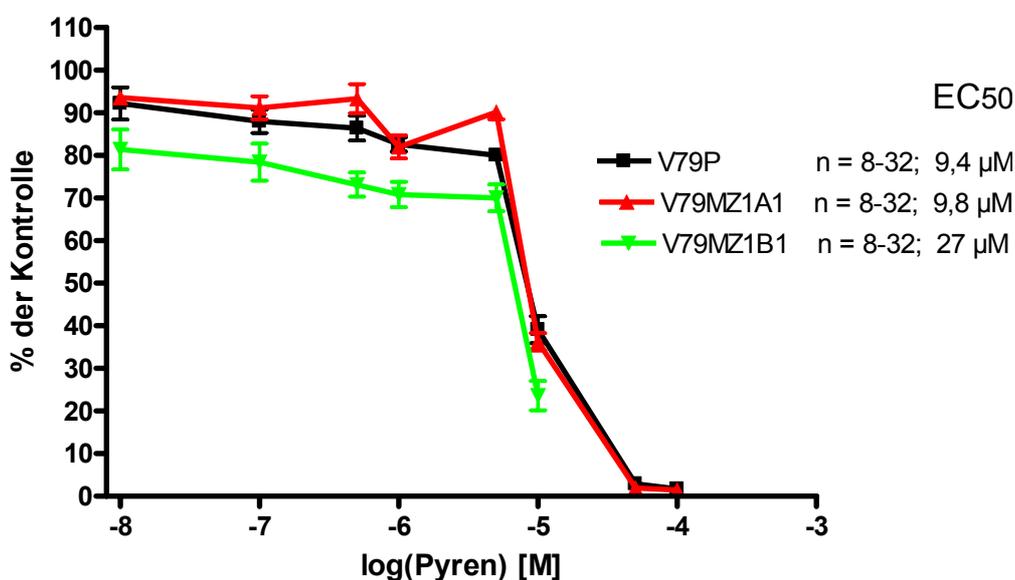


Abb. 28: Cytotoxizität von Pyren in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle, die nur mit dem Lösungsmittel (0,1% DMSO) inkubiert wurde. Der EC_{50} -Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 3 von einander unabhängigen Messtagen; MW \pm SEM.

Tabelle 10: Cytotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit Pyren.

Test	10^{-7} M	10^{-5} M
	p-Werte	
ANOVA	0,0398	0,0038
Newman Keul		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1B1	>0,05	<0,01
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	<0,05	<0,01

5.1.4.2 Genotoxizität (Comet Assay)

Im Rahmen der durch die geringe Löslichkeit von Pyren begrenzten Konzentrationen lässt sich keine Genotoxizität im Comet Assay nachweisen. Weder für die parentalen Zellen noch für Zellen, die CYP1A1 oder CYP1A2 exprimieren, zeigen sich signifikante Unterschiede (Abb. 29).

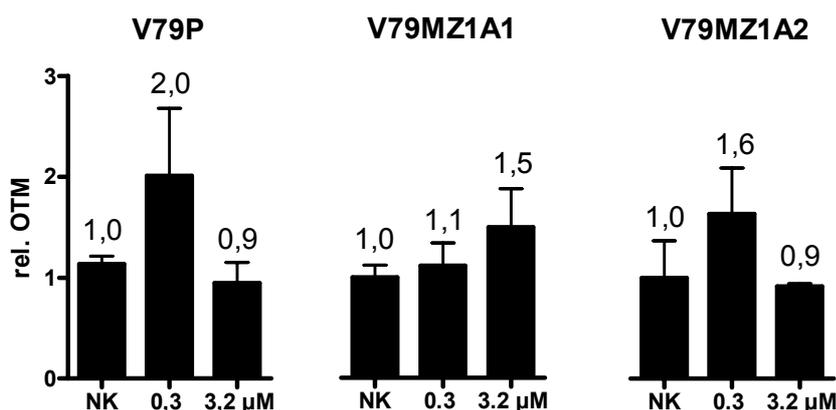


Abb. 29: Genotoxizität von Pyren in V79-Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,04%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,34 (n = 3-5); V79MZ1A1: 0,36 (n = 3-7); V79MZ1A2: 0,52 (n = 3); MW ± SEM.

5.1.5 Benzo[a]pyren

5.1.5.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Ein typisches Beispiel für eine kanzerogene Verbindung, die eine metabolische Aktivierung benötigt, ist der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren, der z.B. in Abgasen und im Zigarettenrauch vorkommt. Durch die CYP1A1 katalysierte Oxidation des B[a]P zum 7,8-Oxid wird die Bildung des ultimalen Kanzerogens anti-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid eingeleitet, welches sich in metabolisch kompetenten V79 Zellen als toxisch erwies [142]. B[a]P wurde im MTT Assay von 0,01 bis 5 µM eingesetzt. Nach 72 h

Inkubation zeigte sich ein Effekt bei der Zelllinie V79MZ1A1 (Abb. 30). Bei einer Konzentration von 0,15 μM wird das Koloniewachstum auf 50% der Kontrollwerte reduziert (EC_{50}). Die anderen Zelllinien (V79P, V79MZ1A2, V79MZ1B1) zeigen in diesem Konzentrationsbereich noch keine bzw. bei V79MZ1B1 in der höchsten Konzentration eine geringe Abnahme des Wachstums. Dies spricht für die dominierende Rolle von CYP1A1 in der metabolischen Aktivierung von B[a]P beim Menschen. Tabelle 11 zeigt die statistische Auswertung für die Konzentrationen von $10^{-7,3}$ und $10^{-5,3}$ M.

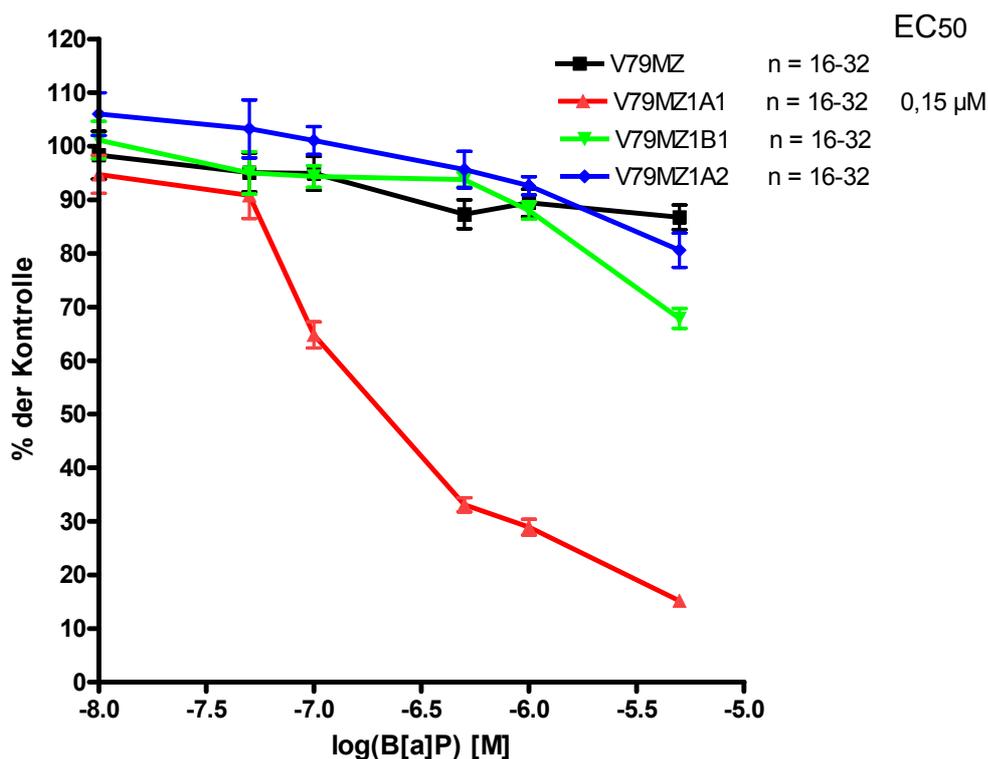


Abb. 30: Cytotoxizität von B[a]P in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle, die nur mit dem Lösungsmittel (0,013% DMSO) inkubiert wurde. Der EC_{50} -Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 3 von einander unabhängigen Messtagen ($n = 16-32$); $\text{MW} \pm \text{SEM}$.

Tabelle 11: Cytotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit Benzo[a]pyren.

Test	$10^{-7,3}$	$10^{-5,3}$
	p-Werte	
ANOVA	0,2468	<0,0001
Newman Keul		
V79P vs V79MZ1A1	>0,05	<0,001
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	<0,05
V79P vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2	>0,05	<0,001
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001
V79MZ1A2 vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001

5.1.5.2 Genotoxizität (Comet Assay)

Der Comet Assay wurde mit B[a]P in den Konzentrationen 0,1 und 1 μM nur je zweimal durchgeführt. Bei der Zelllinie mit humanem CYP1A1 wirkt B[a]P am stärksten genotoxisch und unterscheidet sich konzentrationsabhängig von der unbehandelten Kontrolle (Abb. 31). Auch die Zelllinie V79MZ1A2 zeigt bei der höheren Konzentration einen erhöhten OTM-Wert. Die geringste DNA-Migration ist bei der Zelllinie mit CYP1B1 zu beobachten.

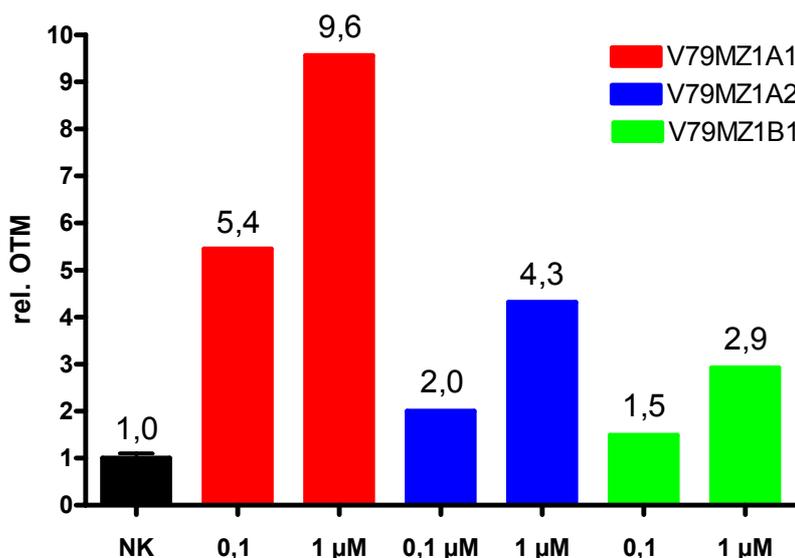


Abb. 31: Genotoxizität von B[a]P in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 20 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,003%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79MZ1A1: 0,27; V79MZ1A2: 0,29; V79MZ1B1: 0,31 (n = 2); MW \pm SEM.

5.1.6 Dibenz[a,l]pyren

5.1.6.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Bei der Verwendung von Dibenz[a,l]pyren zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen den eingesetzten Zelllinien. Bei Luch et al. [78,79] erwies sich dieser PAK in metabolisch kompetenten V79 Zellen als 100fach toxischer als das ultimale mutagene und kanzerogene Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid. Es wird wie auch das B[a]P als kanzerogen für den Menschen angesehen. Abb. 32 zeigt, dass die ermittelten EC_{50} -Werte von 9,59 und 9,73 nM für V79MZ1A1 bzw. V79MZ1B1 denen von Mahadevan et al. (2003) entsprechen [143]. Während sich bei 10^{-9} M nur die Werte von V79MZ1A1 geringfügig unterscheiden ($p < 0,05$), ergibt sich bei 10^{-8} M für die Werte von V79MZ1A1 und V79MZ1B1 ein hoch signifikanter Unterschied zu parental und CYP1A2-exprimierenden Zellen ($p < 0,0001$; Tabelle 12).

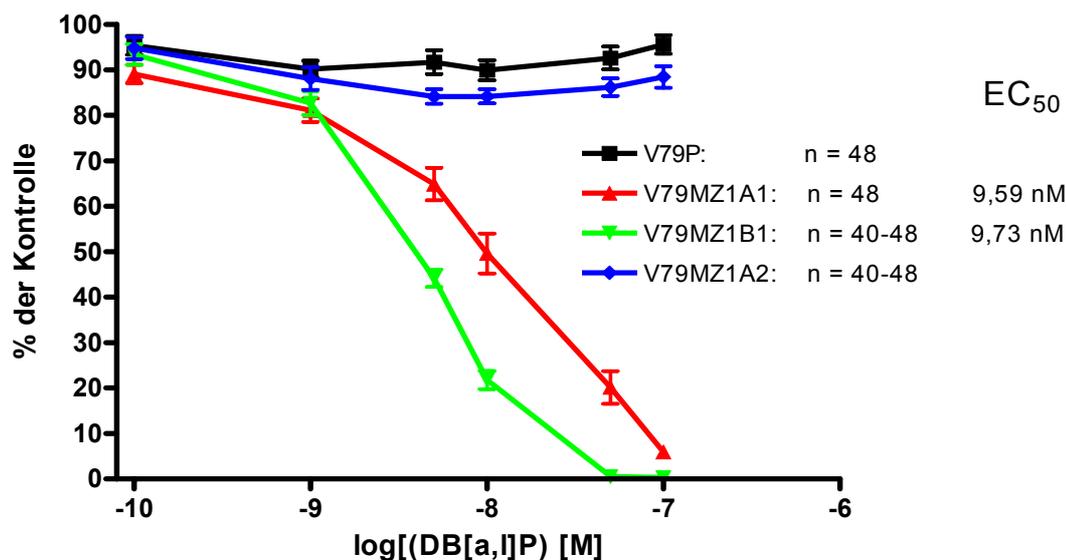


Abb. 32: Cytotoxizität von DB[a,l]P in V79 Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle, die nur mit dem Lösungsmittel (0,1% DMSO) inkubiert wurde. Der EC₅₀-Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert. Die Ergebnisse stammen von 3 von einander unabhängigen Messtagen; MW ± SEM.

Tabelle 12: Cytotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit DB[a,l]P.

Test	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M
	p-Werte	
ANOVA	0,0182	<0,0001
S-N-K		
V79P vs V79MZ1A1	<0,05	<0,001
V79P vs V79MZ1A2	>0,05	>0,05
V79P vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001
V79MZ1A1 vs V79MZ1A2	>0,05	<0,001
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001
V79MZ1A2 vs V79MZ1B1	>0,05	<0,001

5.1.6.2 Genotoxizität (Comet Assay)

Das Ergebnis des Comet Assays mit DB[a,l]P in Konzentrationen von 1,0 bis 31,6 nM zeigen Abb. 33 und Tabelle 13. Entsprechend dem MTT Assay reagieren auch hier die Zelllinien, die CYP1A1 oder CYP1B1 exprimieren, verstärkt auf die Inkubation mit der Testsubstanz. Die Zellen zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme des OTM-Wertes. Die parentalen Zellen werden in diesem niedrigen Konzentrationsbereich nicht geschädigt.

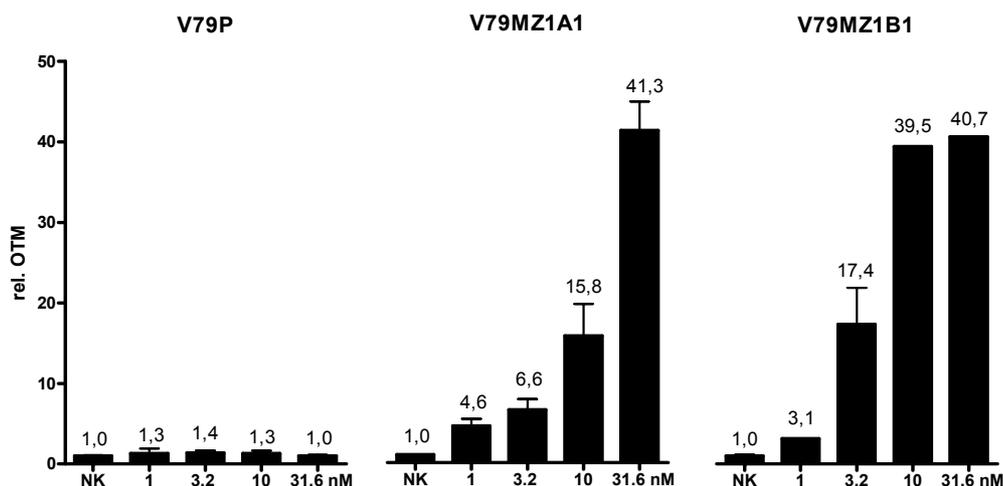


Abb. 33: Genotoxizität von DB[a,l]P in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,01%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,32 (n = 3-12), V79MZ1A1: 0,26 (n = 5-18); V79MZ1B1: 0,29 (n = 2-3); MW ± SEM.

Tabelle 13: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 1,0 bis 31,6 nM DB[a,l]P in absoluten Werten (n.a. = nicht analysiert bei n < 3).

Test	Abhängigkeit von der Konzentration			
	V79P	V79MZ1A1	V79MZ1B1	
ANOVA	0,6984	<0,0001	0,0002	
S-N-K				
NK vs 1,0	>0,05	>0,05	n.a.	
NK vs 3,2	>0,05	<0,05	<0,05	
NK vs 10	>0,05	<0,001	n.a.	
NK vs 32 nM	>0,05	<0,001	n.a.	
	Abhängigkeit vom Zelltyp			
	1,0	3,2	10,0	32 nM
ANOVA	<0,0001			
S-N-K				
V79P vs V79MZ1A1	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001
V79P vs V79MZ1B1	n.a.	>0,05	n.a.	n.a.
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1	n.a.	>0,05	n.a.	n.a.

5.1.6.3 Mutagenität (HPRT Assay)

Die mutagene Potenz von DB[a,l]P ist eindeutig von der metabolischen Aktivierung abhängig. Sie ist am stärksten in den CYP1A1-exprimierenden Zellen ausgeprägt (p<0,001 ab 3,2 nM; Abb. 34; Tabelle 14). Auch bei den V79MZ1B1-Zellen ist im Konzentrationsbereich von 1,0 bis 32 nM ein deutlicher, annähernd linear konzentrationsabhängiger Anstieg der Mutantenfrequenz gegeben. Die in dieser Testreihe mitgeführten parental Zellen zeigten dagegen keine signifikante Zunahme an Mutationen. Das Ergebnis bestätigt, dass DB[a,l]P von humanem CYP1B1 und CYP1A1 sehr effektiv aktiviert wird.

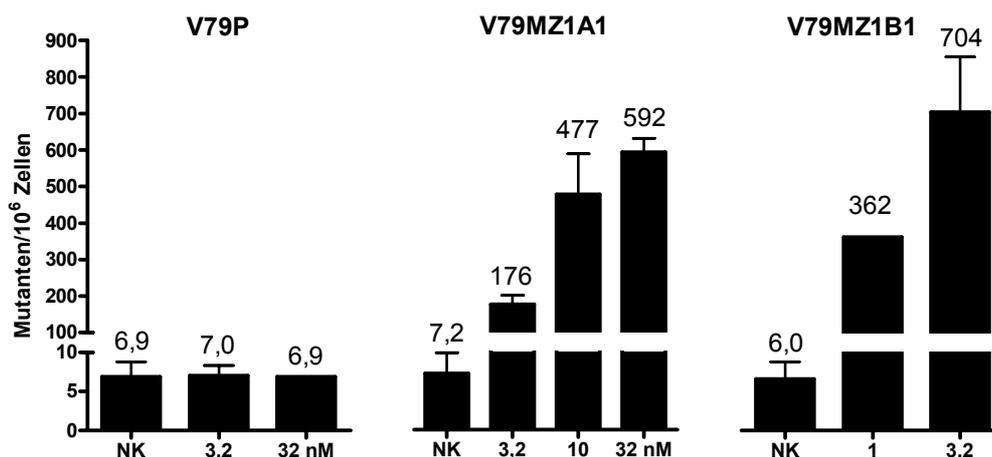


Abb. 34: Mutagener Effekt des DB[a,l]P in V79 Zellen im HPRT-Test. Die Zellen wurden 72 h mit DB[a,l]P inkubiert. Die Kontrolle wurde mit 0,5% DMSO behandelt; V79P: n = 2-5, V79MZ1A1: n = 3-12; V79MZ1B1: n = 2-3; MW \pm SEM.

Tabelle 14: Mutagenität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 1,0 bis 31,6 nM DB[a,l]P (n.a. = nicht analysiert bei n < 3).

Test	Abhängigkeit von der Konzentration			
	V79P	V79MZ1A1	V79MZ1B1	
ANOVA	0,9969	<0,0001	0,0102	
S-N-K				
NK vs 1,0			n.a.	
NK vs 3,2	>0,05	<0,001	<0,01	
NK vs 10		<0,001		
NK vs 32 nM	n.a.	<0,001		
	Abhängigkeit vom Zelltyp			
	1,0	3,2	10,0	32 nM
ANOVA	<0,0001			
S-N-K				
V79P vs V79MZ1A1		>0,05		n.a.
V79P vs V79MZ1B1		<0,001		
V79MZ1A1 vs V79MZ1B1		<0,001		

5.2 Wechselwirkungen

5.2.1 4-Aminobiphenyl mit 100fach höheren Konzentrationen von *m*-Toluidin

5.2.1.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Die Wechselwirkungen zwischen dem kanzerogenen 4-ABP und dem nicht kanzerogenen *m*-Tol wurden entsprechend der Belastung des Menschen mit einem 100fachen Überschuss an *m*-Tol untersucht (Abb. 35). Im MTT-Test bestätigt sich für die Einzelsubstanzen die geringe Toxizität, die bei 4-ABP keine Abhängigkeit von den exprimierten Enzymen zeigt, bei *m*-Tol ein geringfügig höhere Toxizität in den parental Zellen. In der Kombination kommt außer

bei diesen Kontrollzellen zu einer deutlichen Potenzierung der Toxizität, die EC_{50} -Werte verringern sich z.T. um mehr als das Hundertfache. Wegen der geringen Anzahl von Versuchen war eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse nicht möglich.

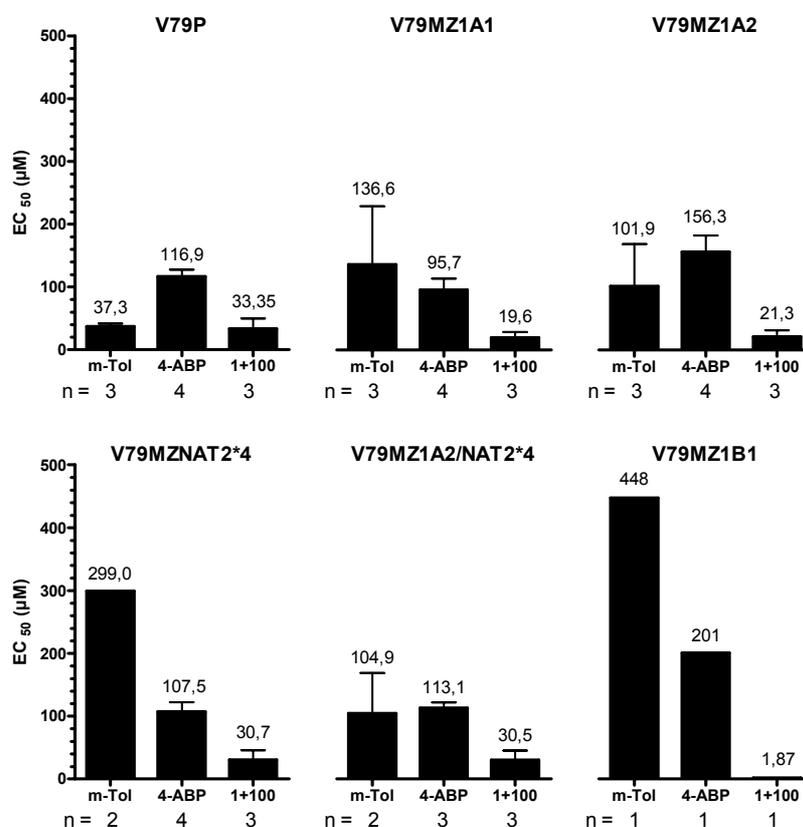


Abb. 35: Wechselwirkung zwischen 4-ABP und *m*-Tol (1+100) in V79MZ Zelllinien; Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen für 72 h; NK behandelt mit 0,05% DMSO. Der EC_{50} -Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert; MW \pm SEM.

5.2.2 *o*-Toluidin mit gleichen und 10fach höheren Konzentrationen von *m*-Toluidin

5.2.2.1 Genotoxizität (Comet Assay)

Versuche zu Wechselwirkungen wurden auch zwischen *o*- und *m*-Toluidin (Abb. 36) durchgeführt. Die Substanzen wurden einzeln in den Konzentrationen 1 und 10 mM eingesetzt und in der Kombination 1+1 (*o*-Tol/*m*-Tol je 1 mM) bzw. 1+10 (1 mM *o*-Tol + 10 mM *m*-Tol) verwendet. Für die Versuche wurde exemplarisch die Zelllinie V79MZ1A2 ausgewählt, da man für dieses Cytochrom eine Rolle im Metabolismus von aromatischen Aminen vermutet. Während *o*-Tol eine konzentrationsabhängige Zunahme der OTM-Werte zeigt, ist *m*-Tol nur in der höheren Konzentration schwach genotoxisch. In der 1+1 und 1+10 Kombination wird der Effekt von *o*-Tol durch *m*-Tol deutlich abgeschwächt. Eine statistische Absicherung ist wegen der geringen Anzahl von Versuchen nicht möglich.

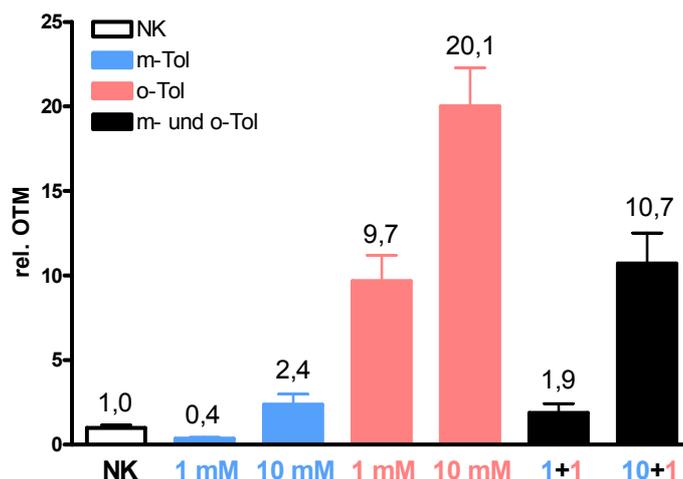


Abb. 36: Wechselwirkung zwischen *o*- und *m*-Tol, bestimmt mit dem Comet Assay in V79MZ1A2 Zellen nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,01%) behandelten Zelllinien. Die Ergebnisse stammen von 2 von einander unabhängigen Messtagen; absoluter OTM-Wert der NK: 0,33 (n = 2); MW ± SEM.

5.2.2.2 Mutagenität (HPRT-Assay)

Wechselwirkungen zwischen *o*- und *m*-Toluidin wurden zusätzlich im HPRT-Test mit den V79MZ1A2-Zellen überprüft (Abb. 37; Tabelle 15). Bei Einzelinkubation mit 1 und 10 mM wirken beide Toluidine dosisabhängig mutagen, *o*-Tol etwas stärker als *m*-Tol. In der 1+1 Kombination (je 1 mM) kommt es zu einer signifikanten Abschwächung der mutagenen Wirkung ($p < 0,0001$), die bei der 1+10 Kombination (1 mM *o*-Tol, 10 mM *m*-Tol) nicht mehr erkennbar ist.

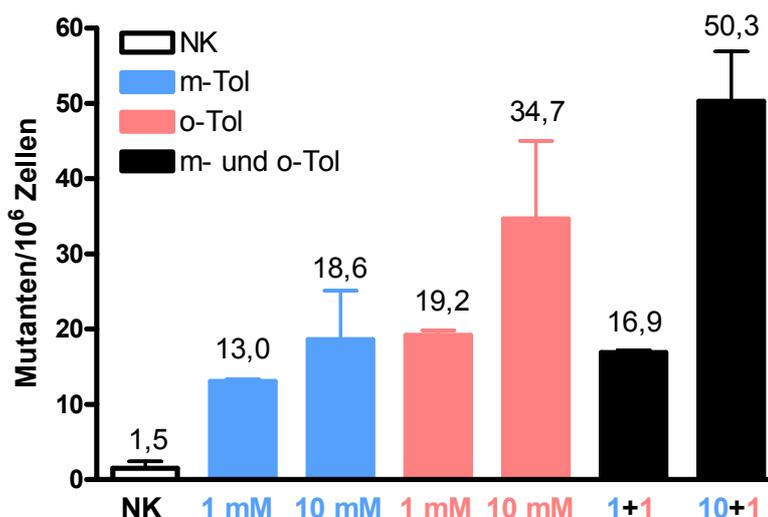


Abb. 37: Mutagener Effekt des *o*- und *m*-Tol alleine und in Kombinationen in V79MZ1A2 Zellen nach 72 h Inkubation im HPRT-Test. Die Kontrolle wurde mit 0,5% DMSO behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 von einander unabhängigen Messtagen (n = 3); MW ± SEM.

Tabelle 15: Mutagenität in V79MZ1A2-Zellen nach 72 h Inkubation mit *o*- und *m*-Tol.

	<i>m</i> -Tol	<i>o</i> -Tol
MW ± SE		
1 mM	13,03 ± 18,60	19,17 ± 0,66
10 mM	0,32 ± 6,53	34,66 ± 10,34
	<i>m</i> -Tol + <i>o</i> -Tol	
	1+1	1+10
MW ± SE	16,90 ± 0,29	50,25 ± 6,64
komb. MW ± SE	32,2 ± 0,73	37,77 ± 6,56
Test	1+1	1+10
p-Wert	<0,0001	0,25

5.2.3 Wechselwirkung von Dibenzo[a,l]pyren und Pyren

5.2.3.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Im folgenden Ansatz wurden die Zelllinien, welche CYP1A1 bzw. CYP1B1 exprimieren mit DB[a,l]P und dem nicht kanzerogenen Pyren einzeln und mit beiden Substanzen in Kombination untersucht (Abb. 38). Dabei wurde das Pyren gegenüber dem DB[a,l]P in 100- bzw. 1000fachem Überschuss eingesetzt. Für die Einzelinkubationen bestätigt sich der große Unterschied in der Cytotoxizität von Pyren und DB[a,l]P. Ein Kombinationseffekt im Sinne einer deutlichen Abschwächung der Toxizität ist nur bei CYP1B1-exprimierenden Zellen und einem 1000fachen Überschuss von Pyren zu beobachten. Eine statistische Bewertung ist wegen der geringen Anzahl von Versuchen nicht möglich.

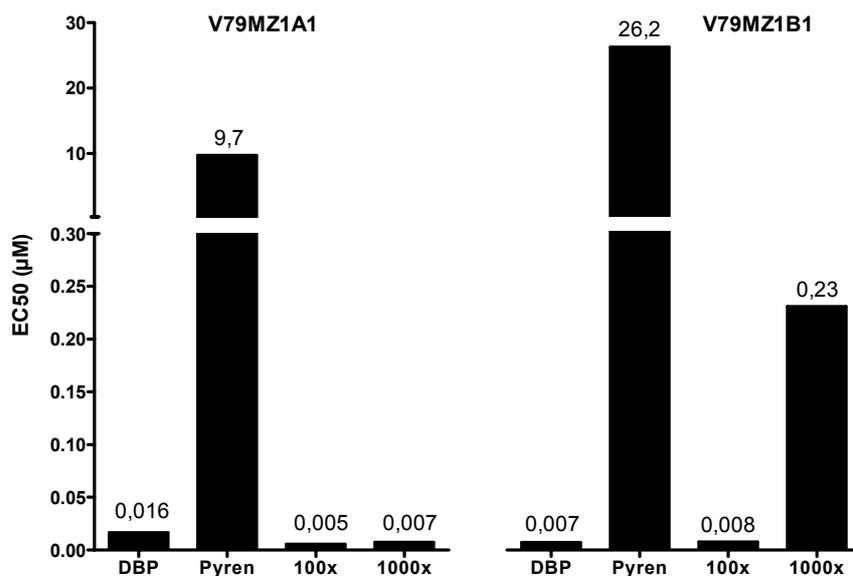


Abb. 38: Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und Pyren in 100 bzw. 1000fachem Überschuss in den V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay. Der EC₅₀-Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert; MW (n = 2).

5.2.3.2 Genotoxizität (Comet Assay)

Bei der Untersuchung von Wechselwirkungen auf genotoxischer Ebene zwischen DB[a,l]P und Pyren in den Zelllinien V79MZ1A1 und V79MZ1B1 wurde das nicht kanzerogene Pyren entsprechend seiner höheren Umweltpräsenz in 100- und 1000fachem Überschuss gegenüber DB[a,l]P eingesetzt (Abb. 39; Tabelle 16). Während 3,2 nM DB[a,l]P alleine dessen starke Genotoxizität bestätigt, ist bei Pyren alleine mit 0,3 und 3,2 µM kein genotoxischer Effekt zu verzeichnen. Wird nun Pyren in 100- oder 1000fachem Überschuss zum DB[a,l]P zugegeben, schwächt es die genotoxische Wirkung von DB[a,l]P konzentrationsabhängig ab. Die Unterschiede sind bei den V79MZ1A1 Zellen nicht signifikant, bei den V79MZ1B1 Zellen ($n < 3$) war keine statistische Prüfung möglich.

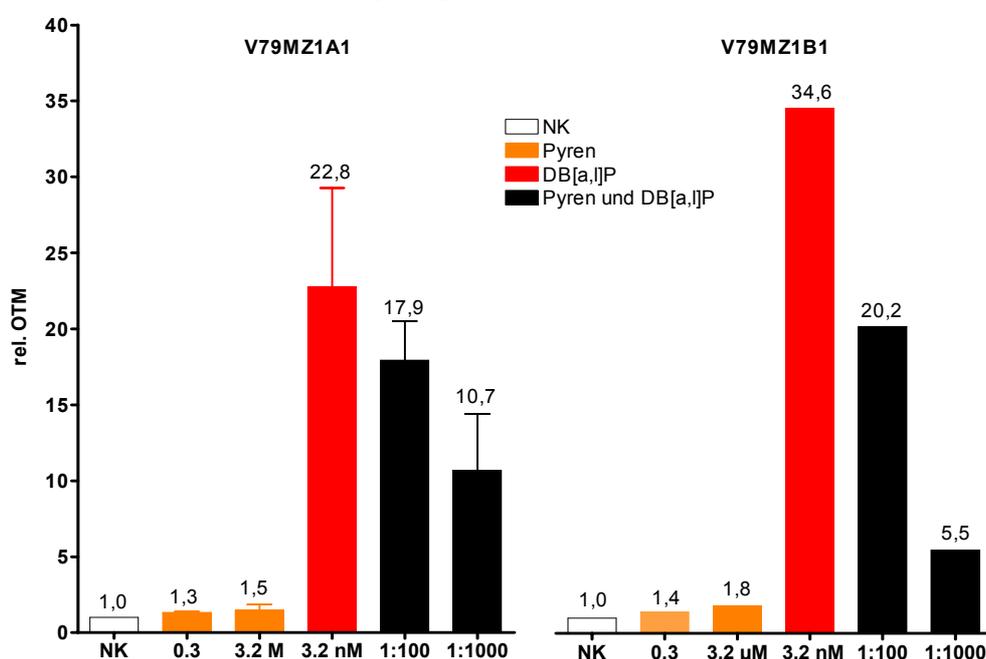


Abb. 39: Wechselwirkung von DB[a,l]P und Pyren in 100- bzw. 1000fachem Überschuss, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,04%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79MZ1A1: 0,33 ($n = 4-8$); V79MZ1B1: 0,20 ($n = 2$); .MW ($n < 3$) bzw. MW \pm SEM ($n > 3$).

Tabelle 16: Genotoxizität in V79MZ1A1-Zellen nach 72 h Inkubation mit Pyren und DB[a,l]P in absoluten Werten.

	Pyren	DB[a,l]P
MW \pm SEM		
3,2 nM		7,52 \pm 2,14
0,3 µM	0,44 \pm 0,02	
3,2 µM	0,49 \pm 0,13	
	Pyren + DB[a,l]P	
	1+100	1+1000
MW \pm SEM	5,92 \pm 0,85	3,53 \pm 1,23
komb. MW \pm SEM	7,96 \pm 2,14	8,01 \pm 2,14
t-Test (p)	0,40	0,12

5.2.3.3 Mutagenität (HPRT-Assay)

Um herauszufinden, inwiefern sich die mutagene Potenz nach gemeinsamer Inkubation von DB[a,l]P mit Pyren verändert, wurde zusätzlich ein HPRT-Test durchgeführt (Abb. 40). Hier wurden neben den V79MZ1A1-Zellen zum Vergleich parentale Zellen in den Test einbezogen. Die Mutantenzahlen pro 10^6 Zellen liegen für die jeweiligen Negativkontrollen unterhalb der Spontanmutationsrate von 10. In den parentalen Zellen entstehen durch die Inkubation mit DB[a,l]P (3,2 nM) etwa 135 Mutanten im Vergleich zu 38 nach Inkubation mit 3,2 μ M Pyren. In den CYP1A1-exprimierenden Zellen werden durch DB[a,l]P deutlich mehr Mutationen ausgelöst, während das Pyren alleine praktisch keine Mutationen hervorruft. Die geringfügige Steigerung der Mutantenzahl nach Kombination von DB[a,l]P mit 1000fachem Überschuss von Pyren konnte wegen zu geringer Anzahl an Versuchen statistisch nicht abgesichert werden. Das gleiche gilt für die Abschwächung der Mutagenität in der parentalen Zelllinie.

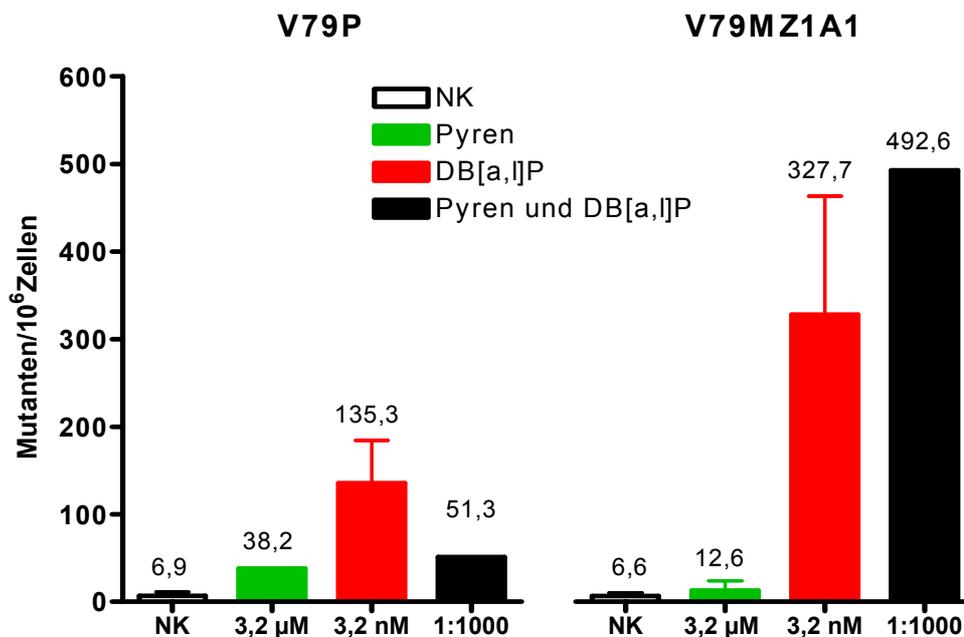


Abb. 40: Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und Pyren in 1000fachem Überschuss in V79MZ-Zellen im HPRT-Test; Inkubation für 72 h; Behandlung der NK mit 0,05% DMSO; V79P: n = 2-6; V79MZ1A1: n = 2-5; MW (n<3) bzw. MW \pm SEM (n>3).

5.2.4 Wechselwirkung von Dibenzo[a,l]pyren und 4-Aminobiphenyl bzw. o-Toluidin

5.2.4.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Es wurden zunächst auf cytotoxischer Ebene in V79MZ1A1-Zellen Wechselwirkungen zwischen DB[a,l]P und den aromatischen Aminen, o-Tol und 4-ABP, untersucht (Abb. 41). Bei der Untersuchung der Einzelsubstanzen bestätigte sich die hohe Cytotoxizität von DB[a,l]P, die sich um 4 Zehnerpotenzen von den aromatischen Aminen unterscheidet. Bei der gleich-

zeitigen Gabe äquimolarer Mengen wird die Cytotoxizität des DB[a,l]P durch *o*-Tol noch leicht gesteigert. Dagegen hebt die zusätzliche Inkubation mit 4-ABP die Cytotoxizität von DB[a,l]P völlig auf. Statistisch sind diese Ergebnisse wegen der nur zweimaligen Durchführung des MTT-Tests nicht abzusichern.

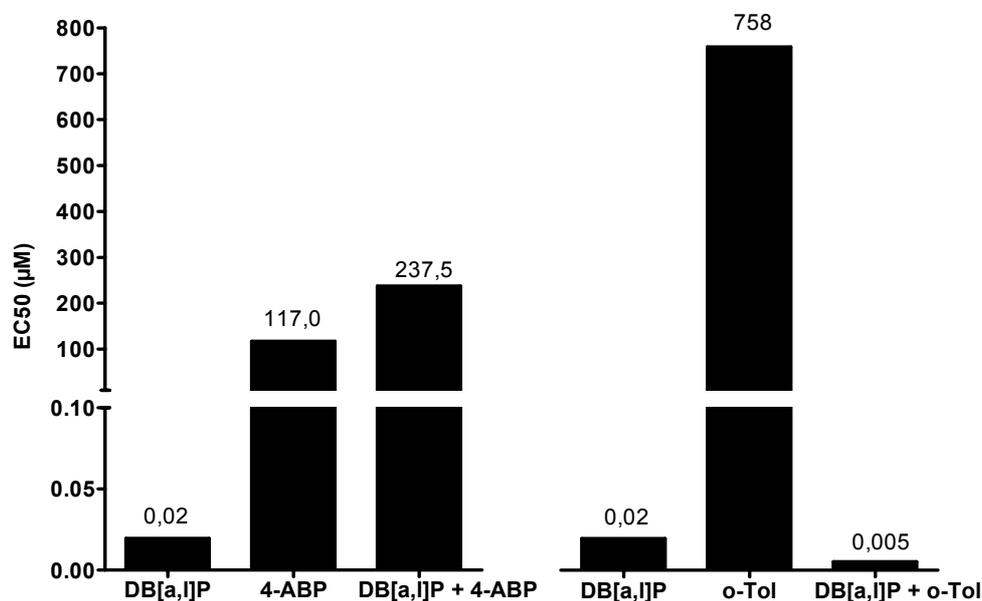


Abb. 41: Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und *o*-Tol bzw. 4-ABP in äquimolaren Konzentrationen, bestimmt mit dem MTT Assay in der Zelllinie V79MZ1A1. Der EC₅₀-Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 72 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert; MW (n = 2).

5.2.4.2 Genotoxizität (Comet Assay)

Die Wechselwirkungen hinsichtlich der Genotoxizität wurden zwischen DB[a,l]P und *o*-Tol bzw. 4-ABP bei verschiedenen Zelllinien untersucht. Bei den V79MZ1B1-Zellen ist nach 72 h Inkubation mit den aromatischen Aminen alleine keine Genotoxizität zu erreichen, während DB[a,l]P bereits in einer Konzentration von 3,2 nM die Kometenbildung deutlich erhöht (Abb. 42). In der Kombination zeigen die Doppeluntersuchungen keine wesentliche Beeinflussung wird Genotoxizität von DB[a,l]P durch die aromatischen Amine.

In den V79MZ1A1 Zellen ist der genotoxische Effekt von DB[a,l]P vergleichbar zu dem in den CYP1B1-exprimierenden Zellen (Abb. 43), die aromatischen Amine sind mit Ausnahme einer geringen Steigerung bei 3,2 µM *o*-Tol wirken auch hier nicht genotoxisch. Bei den Wechselwirkungen zeichnet sich dagegen eine deutliche Abschwächung der Genotoxizität von DB[a,l]P ab und wird durch den 1000fachen Überschuss and *o*-Tol vollständig aufgehoben. Auch diese Doppelbestimmungen erlauben keine statistische Bewertung.

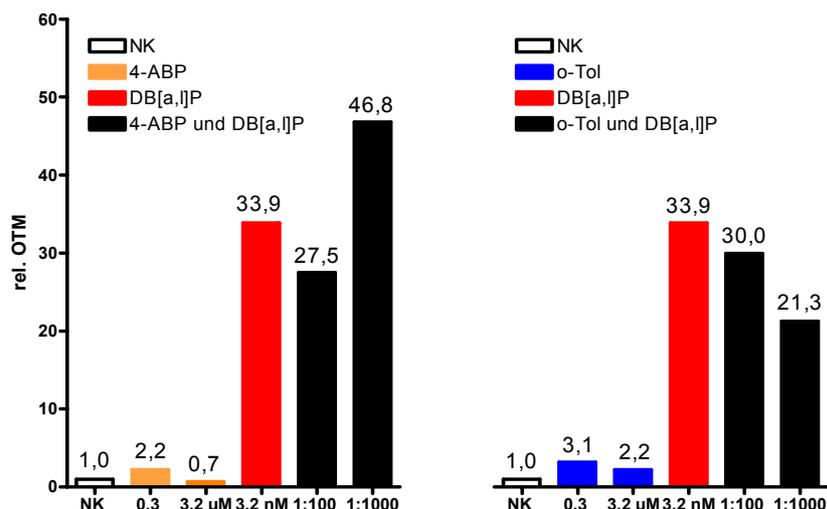


Abb. 42: Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und 4-ABP bzw. *o*-Tol in der Zelllinie V79MZ1B1, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,05%) behandelten Zelllinien; absoluter OTM-Wert der NK: 0,32 (n = 2); MW.

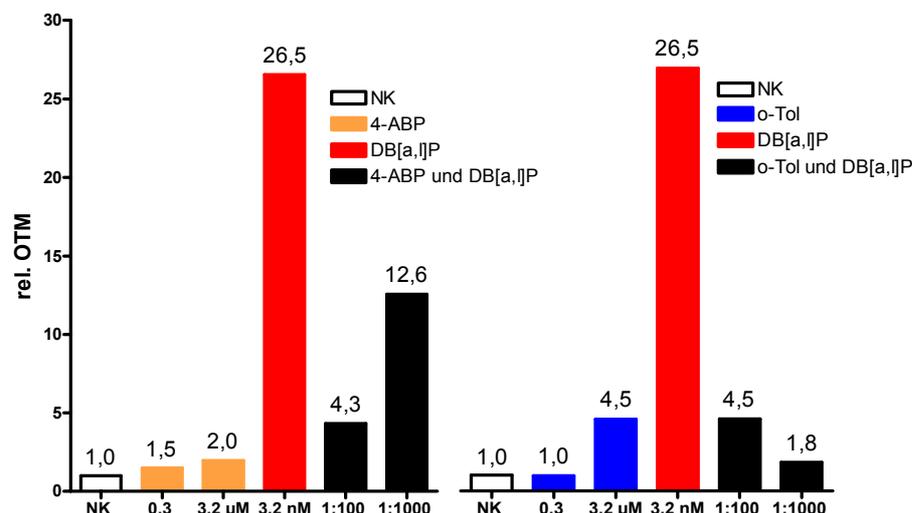


Abb. 43: Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und 4-ABP bzw. *o*-Tol in der Zelllinie V79MZ1A1, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,05%) behandelten Zelllinien; absoluter OTM-Wert der NK: 0,26 (n = 2); MW.

In parentalen und CYP1A2-exprimierenden Zellen wirkt DB[a,l]P fast nicht genotoxisch (Abb. 44 und 45). Es bestätigt sich die Notwendigkeit einer metabolischen Aktivierung durch CYP1A1 oder CYP1B1 für die Ausprägung der starken Genotoxizität von DB[a,l]P. *o*-Tol ist bei der niedrigen Konzentration von 3,2 nM in parentalen und V79MZ1A2-Zellen ebenfalls nur schwach genotoxisch. In der Kombination addieren sich bei den parentalen Zellen diese schwachen Effekte nicht, es kommt zu signifikant geringeren OTM-Werten als durch die Addition zu erwarten wäre (Tabelle 17).

4-ABP ist wie *o*-Tol in der Konzentration von 3,2 nM in parentalen wie CYP1A2-exprimierenden Zellen nur schwach genotoxisch (Abb. 45; Tabelle 18). In Kombination mit DB[a,l]P

kommt es in beiden Zelllinien zu einem signifikant geringeren Effekt im Vergleich zur Addition der Einzelergebnisse.

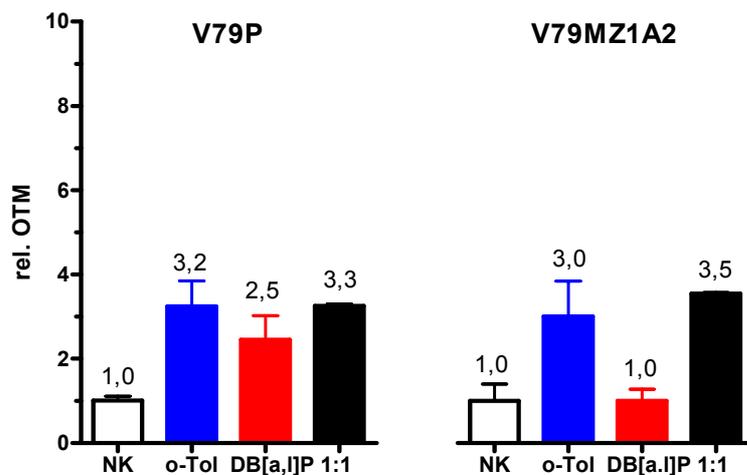


Abb. 44: Wechselwirkung zwischen o-Tol und DB[a,l]P, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,05%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,2 (n = 3-4); V79MZ1A2: 0,29 (n = 3-6); MW \pm SEM.

Tabelle 17: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit o-Tol und DB[a,l]P in absoluten Werten.

	V79P		V79MZ1A2	
	o-Tol	DB[a,l]P	o-Tol	DB[a,l]P
	3,2 nM		3,2 nM	
MW \pm SEM	0,65 \pm 0,12	0,49 \pm 0,11	0,87 \pm 0,25	0,29 \pm 0,08
	1+1		1+1	
MW \pm SEM	0,19 \pm 0,04		0,42 \pm 0,11	
komb. MW \pm SEM	1,14 \pm 0,17		1,16 \pm 0,26	
t-Test (p)	0,0054		0,0570	

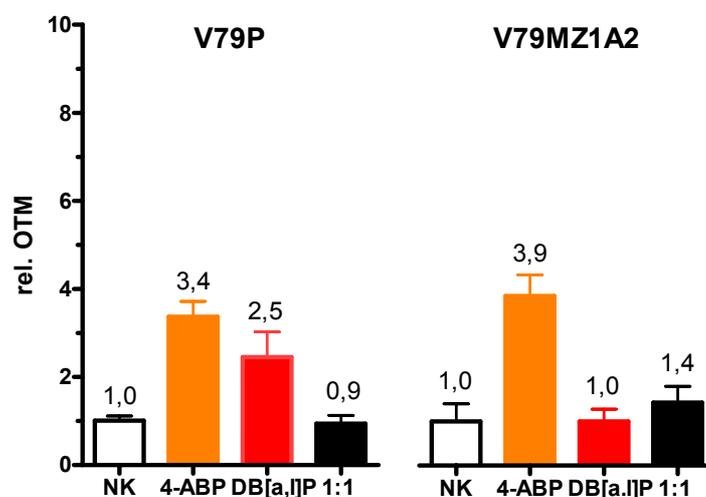


Abb. 45: Wechselwirkung zwischen 4-ABP und DB[a,l]P, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Negativkontrollen (NK) der nur mit DMSO (0,05%) behandelten Zelllinien; absolute OTM-Werte der NK: V79P: 0,2 (n = 3-5); V79MZ1A2: 0,29 (n = 3-6); MW \pm SEM.

Tabelle 18: Genotoxizität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 4-ABP und DB[a,l]P in absoluten Werten.

	V79P		V79MZ1A2	
	4-ABP	DB[a,l]P	4-ABP	DB[a,l]P
	3,2 nM		3,2 nM	
MW ± SEM	0,67 ± 0,07	0,49 ± 0,11	1,12 ± 0,14	0,49 ± 0,11
	1+1		1+1	
MW ± SEM	0,65 ± 0,02		1,03 ± 0,01	
komb. MW ± SEM	1,16 ± 0,13		1,61 ± 0,18	
t-Test (p)	0,0179		0,0324	

5.2.4.3 Mutagenität (HPRT-Assay)

Die Wechselwirkung zwischen DB[a,l]P und 4-ABP wurde auch im HPRT-Test überprüft (Abb. 46; Tabelle 19). In CYP1A1-exprimierenden Zellen löst die alleinige Gabe von 3,2 nM 4-ABP keine Mutationen aus, während sich die mutagene Wirkung von DB[a,l]P bestätigt. In der Kombination mit 4-ABP wird die Mutantenzahl von DB[a,l]P in der V79MZ1A1-Zelllinie signifikant herabgesetzt. In den parental Zellen ist die Mutationsrate wesentlich geringer, in der Kombination kommt es zu einem schwachen, nicht signifikanten additiven Effekt.

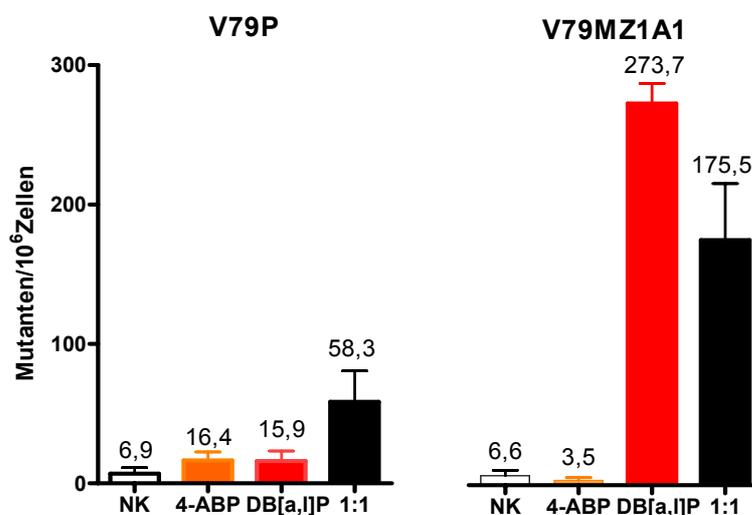


Abb. 46: Wechselwirkung zwischen 4-ABP und DB[a,l]P (jeweils 3,2 nM) im HPRT-Test; Inkubation für 72 h in V79MZ-Zellen; Behandlung der NK mit 0,05% DMSO; V79P: n = 3-6; V79MZ1A1: n = 3-5; MW ± SEM.

Tabelle 19: Mutagenität in V79MZ-Zellen nach 72 h Inkubation mit 4-ABP und DB[a,l]P.

	V79P		V79MZ1A1	
	4-ABP	DB[a,l]P	4-ABP	DB[a,l]P
	3,2 nM		3,2 nM	
MW ± SEM	16,40 ± 6,02	15,9 ± 7,23	3,490 ± 1,175	273,7 ± 8,96
	4-ABP + DB[a,l]P: 1+1			
MW ± SEM	58,27 ± 22,31		175,5 ± 25,73	
komb. MW ± SEM	32,29 ± 9,41		277,19 ± 9,04	
t-Test (p)	0,34		0,0039	

5.2.5 Wechselwirkung von Pyren in 100- und 1000fach höheren Konzentrationen mit 4-Aminobiphenyl

5.2.5.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

In dem durch die Löslichkeit von Pyren begrenzten Konzentrationsbereich (max. Konzentration von Pyren: 3,2 μ M), wird weder mit 100- noch mit 1000fachem Überschuss von Pyren in Kombination mit 4-ABP eine ausreichend hohe Cytotoxizität erreicht (Abb. 47 und 48; Tabelle 20 und 21). Ob es eine Kombinationswirkung des aromatischen Amins mit dem polyzyklischen Kohlenwasserstoff auf Ebene der Cytotoxizität gibt, kann deshalb bei den eingesetzten Zelllinien, V79P, V79MZ1A1 und V79MZ1A2, nicht beurteilt werden. Auf eine statistische Auswertung wurde deshalb verzichtet.

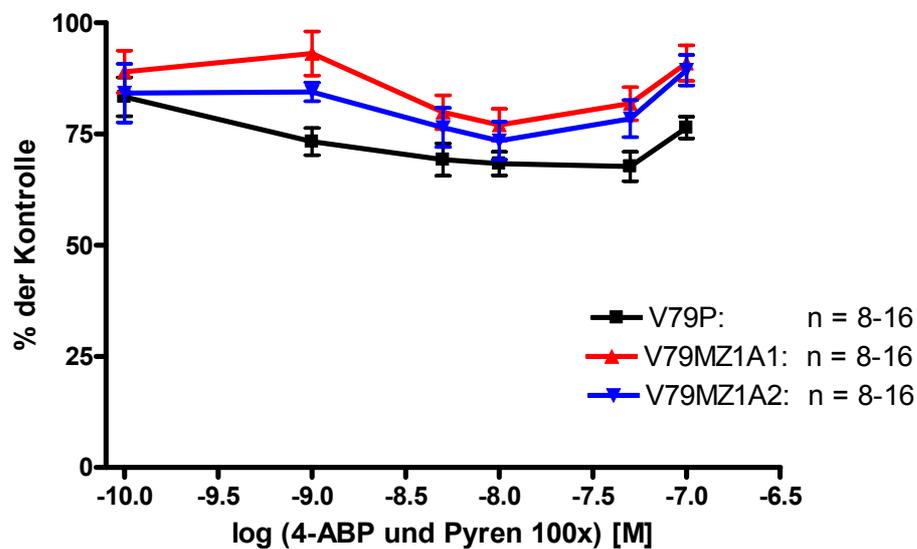


Abb. 47: Wechselwirkung zwischen 4-ABP und 100fach Pyren in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay nach 72 h Inkubation. MW \pm SEM.

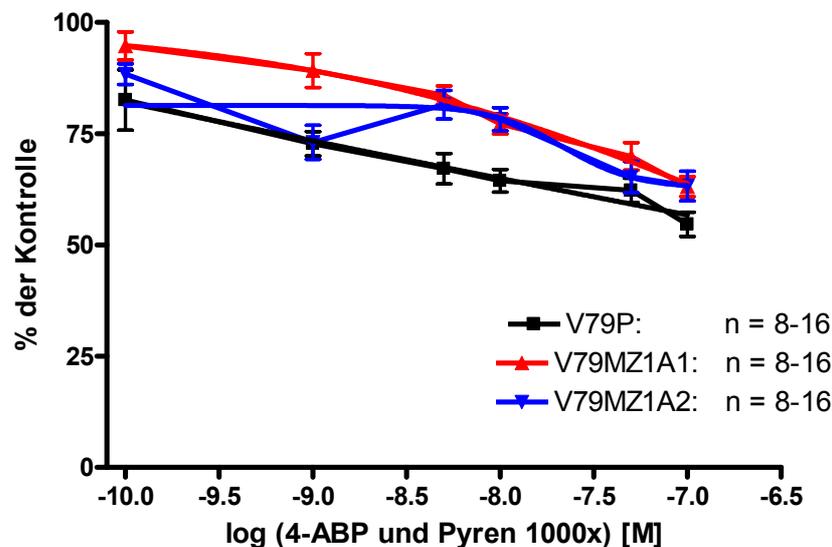


Abb. 48: Wechselwirkung zwischen 4-ABP und 1000fach Pyren in V79MZ Zelllinien, bestimmt mit dem MTT Assay nach 72 h Inkubation. MW \pm SEM.

5.2.5.2 Mutagenität (HPRT-Assay)

Im HPRT-Test bleiben alle Ergebnisse mit Pyren und 4-ABP alleine und in der Kombination im Bereich der Kontrollwerte (Abb. 49). Eine mögliche Kombinationswirkung lässt sich auch aus diesem Ergebnis nicht ableiten.

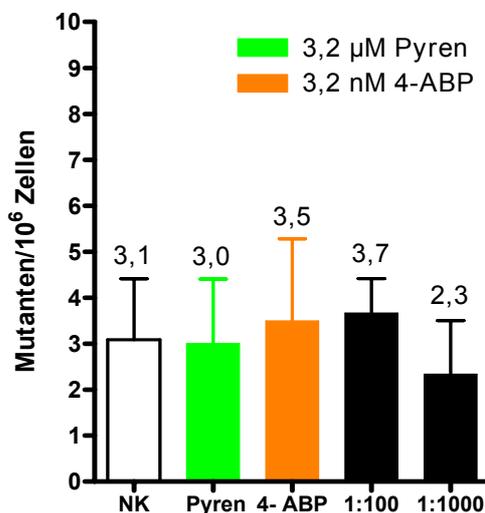


Abb. 49: HPRT Assay zu Wechselwirkungen zwischen 4-ABP und 100- bzw. 1000fach Pyren; Inkubation für 72 h in V79MZ1A1-Zellen. Behandlung der NK mit 0,05% DMSO; n = 3-5; MW ± SEM.

5.3 Bestimmung von DNA-Addukten mit ³²P-Postlabeling

Das ³²P-Postlabeling stellt eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Fremdstoffen dar, die kovalent an Basen der DNA gebunden sind. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse zeigen die Grenzen, aber auch die Möglichkeiten dieser Alternative zu den anderen Testverfahren dieser Studie.

5.3.1 DNA-Addukte von aromatischen Aminen

Mit 4-ABP konnte nur bei der niedrigeren Konzentration von 10 µM eine diagonale radioaktive Zone (DRZ) auf den DC-Platten erkannt werden (Abb. 50). Sie war bei der Zelle mit Koexpression von CYP1A2 und NAT2*4 deutlich gegenüber der V79MZ1A2-Zellen abgeschwächt (Tab. 20). Innerhalb der DRZ sind nur andeutungsweise diskrete Adduktspots zu erkennen, die dem bekannten Hauptaddukt von 4-ABP, dem Desoxyguanosin-8-yl-4-ABP [144] entsprechen könnten. Bei Einsatz von 100 µM 4-ABP ist nur noch bei den V79MZ1B1-Zellen eine DRZ erkennbar, die geringer ausfällt als nach der niedrigeren Konzentration (Abb. 51). Bei den CYP1A1- und CYP1A2-exprimierenden Zellen ist keine DRZ nachweisbar.

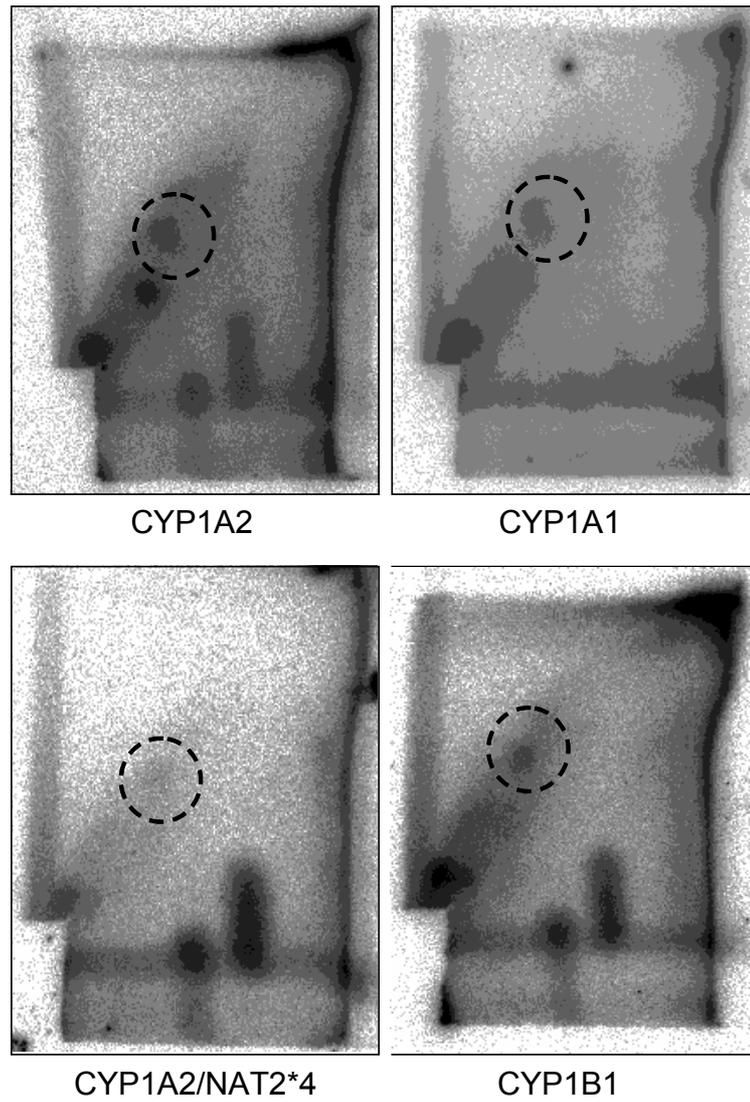


Abb. 50: ^{32}P -DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach Inkubation für 72 h mit $10\ \mu\text{M}$ 4-ABP. Die Kreise geben die mutmaßliche Position von Desoxyguanosin-8-yl-4-ABP an.

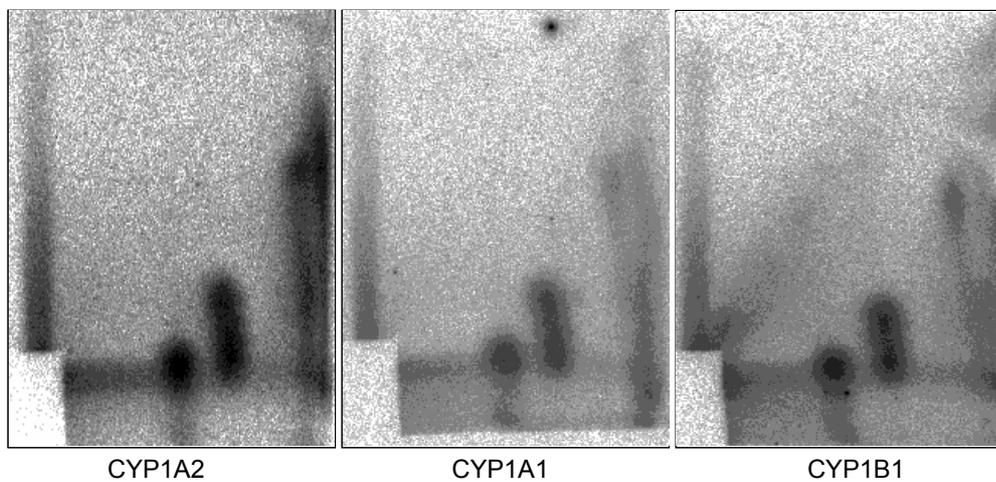


Abb. 51: ^{32}P -DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach Inkubation für 72 h mit $100\ \mu\text{M}$ 4-ABP.

Tabelle 20: Radioaktivitätsgehalt (dpm) in der diagonalen Zone der DC-Chromatogramme von DNA nach 72 h Inkubation der Zellen mit aromatischen Aminen.

Aromatisches Amin	Konzentration [μM]	V79MZ 1A1	V79MZ 1A2	V79MZ 1B1	V79MZ 1A2/NAT2*4
4-ABP	10	15.273	6.725	6.643	2.068
4-ABP	100	457	363	3.349	n.a.
<i>o</i>-Tol	8000	406	n.a.	n.a.	n.a.
<i>o</i>-Tol	16000	n.a.	n.a.	278	n.a.
<i>m</i>-Tol	1000	5.710	889	1.486	8.706
4-ABP + <i>m</i>-Tol	10 + 1000	4.175	443	681	5.926

Mit hohen Konzentrationen von *o*-Toluidin (8 und 16 mM) wurden keine Addukte gesehen (Abb. 52). Nach Inkubation der Zellen mit 1 mM *m*-Toluidin ist eine DRZ erkennbar, die in der Reihenfolge CYP1A2/NAT2*4 > CYP1A1 > CYP1B1 > CYP1A2 abnimmt (Tabelle 20).

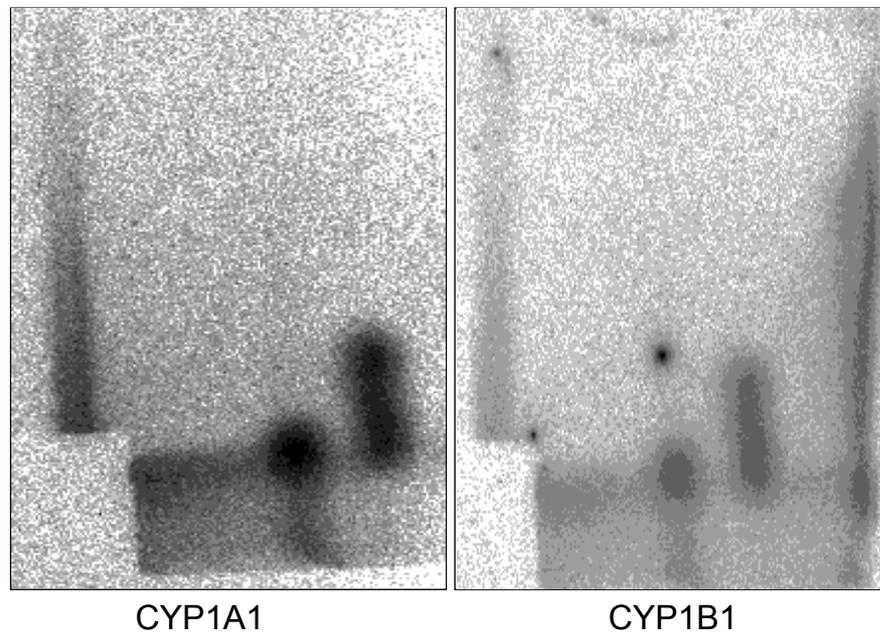


Abb. 52: ^{32}P -DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach Inkubation für 72 h mit 8 mM *o*-Tol.

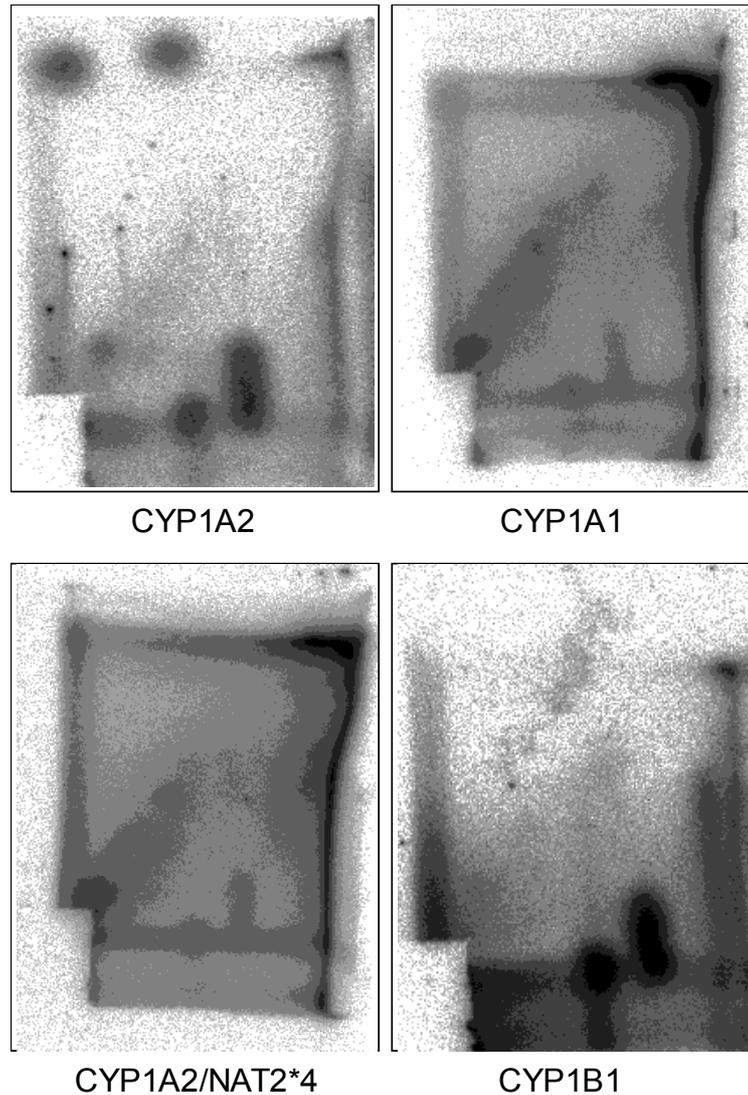


Abb. 53: ^{32}P -DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach Inkubation für 72 h mit 1 mM *m*-Tol.

Die Inkubation mit einem Gemisch aus 10 μM 4-ABP und 1000 μM *m*-Tol führt bei den CYP1A2- und CYP1B1-exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Reduktion der DRZ. In den CYP1A1-exprimierenden und den CYP1A2/NAT2*4 koexprimierenden Zellen ist die DRZ nach Ko-Inkubation ebenfalls niedriger als nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen, d.h. auch hier ist eine Hemmung der DNA-Adduktbildung gegeben (Tab. 20).

5.3.2 DNA-Addukte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Die hohe genotoxische und mutagene Potenz von DB[a,l]P in CYP1A1- und CYP1B1-exprimierenden Zellen spiegelt sich auch in den DNA-Addukten wieder (Abb. 54). Trotz Einsatz einer sehr niedrigen Konzentration von 76 nM DB[a,l]P sind in der starken DRZ eine Reihe von Adduktspots erkennbar. Der große Spot nahe am Auftragspunkt entspricht sehr

lipophilen Addukten, die auf der DC nur eine sehr geringe Migration aufweisen. In der DRZ wurden mit insgesamt 450.326 dpm bei den CYP1A1-exprimierenden Zellen deutlich mehr Radioaktivität nachgewiesen als mit 148.940 dpm bei den V79MZ1B1-Zellen. Dieser Einzelbefund steht im Gegensatz zur stärker mutagenen und genotoxischen Wirkung von CYP1B1- gegenüber CYP1A1-exprimierenden Zellen. Die hohe Adduktrate und die zahlreichen Adduktspots lassen das ^{32}P -Postlabeling als effektives Testverfahren erscheinen, um Wechselwirkungen von DB[a,l]P mit anderen Umweltschadstoffen auf der Ebene einzelner Addukte zu untersuchen.

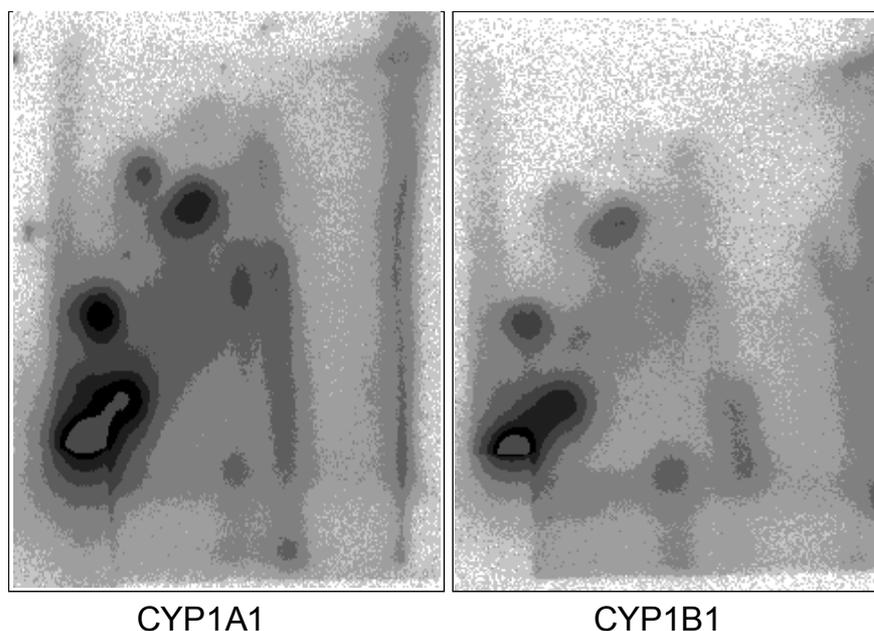


Abb. 54: ^{32}P -DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach Inkubation für 72 h mit 76 nM DB[a,l]P.

5.4 MNNG als Positivkontrolle

Das als Positivkontrolle eingesetzte N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) gehört in die Gruppe der Nitrosamide. Während bei den Nitrosaminen die für die kanzerogene Wirkung relevanten reaktiven Intermediate, elektrophile Diazohydroxidverbindungen, Diazonium- bzw. Carbeniumionen, erst durch metabolische Aktivierung gebildet werden, unterliegt MNNG im wässrigen System einem spontanen Zerfall. Die gebildeten reaktionsfähigen Gruppen können mit DNA, RNA und Proteinen eine kovalente Bindung eingehen und so zu Cytotoxizität und Genotoxizität führen [145]. MNNG ist im Tierversuch eindeutig kanzerogen: So wurden zum Beispiel Veränderungen des Gastrointestinaltrakts beschrieben [146] oder gehäuftes Auftreten von Hautkrebs bei Mäusen [147]. Die IARC stuft MNNG in die Gruppe 2A, als wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen ein (<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/grlist.html>). Es konnte an Lymphoblasten gezeigt werden, dass MNNG nicht nur

mutagene und kanzerogene Wirkung hat, sondern auch cytotoxisch ist, da es zum programmierten Zelltod, zur Apoptose führen kann [148]. Die hier beispielhaft gezeigten Ergebnisse wurden nicht statistisch bewertet.

5.4.1 Cytotoxizität (MTT Assay)

Zur Messung von Vitalität und Wachstum der Zellen wurde der MTT-Test verwendet. In unseren Experimenten zeigt MNNG eine erhöhte Cytotoxizität ab 50 μM MNNG (Abb. 55).

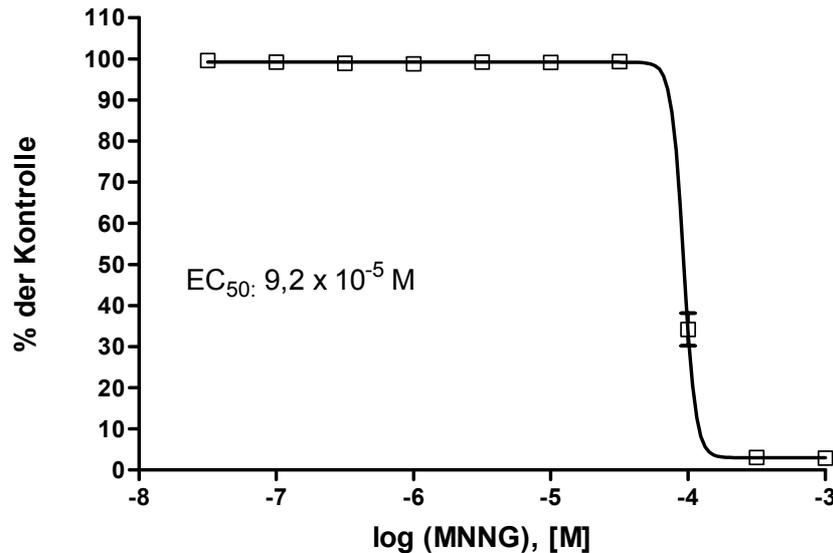


Abb. 55: Cytotoxizität von MNNG in V79P Zellen, bestimmt mit dem MTT Assay. Die Werte beziehen sich auf die Kontrolle, die nur mit dem Lösungsmittel (0,01% DMSO) inkubiert wurde. Der EC_{50} -Wert stellt die Substratkonzentration dar, die das Koloniewachstum in 2 h auf 50% der Kontrollwerte reduziert; $MW \pm SEM$ ($n = 8$).

5.4.2 Genotoxizität (Comet Assay)

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten erzeugte MNNG eine dosisabhängige massive DNA-Fragmentierung (Abb. 56).

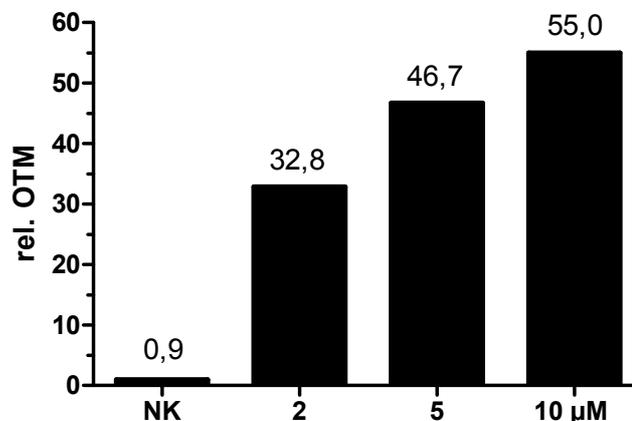


Abb. 56: Genotoxizität von MNNG in V79P Zellen, bestimmt mit dem Comet Assay nach 2 h Inkubation. Die relativen Werte beziehen sich auf den Mittelwert der Negativkontrolle (NK), der nur mit DMSO (0,01%) behandelten Zellen. ($n = 1$); $MW \pm SEM$.

5.4.3 Mutagenität (HPRT Assay)

Auch im HPRT-Test bestätigte sich die starke mutagene Wirkung von MNNG auf V79P Zellen (Abb. 57). Die Mutantenzahl nimmt konzentrationsabhängig auf bis zu 1800 Mutanten pro 10^6 Zellen zu.

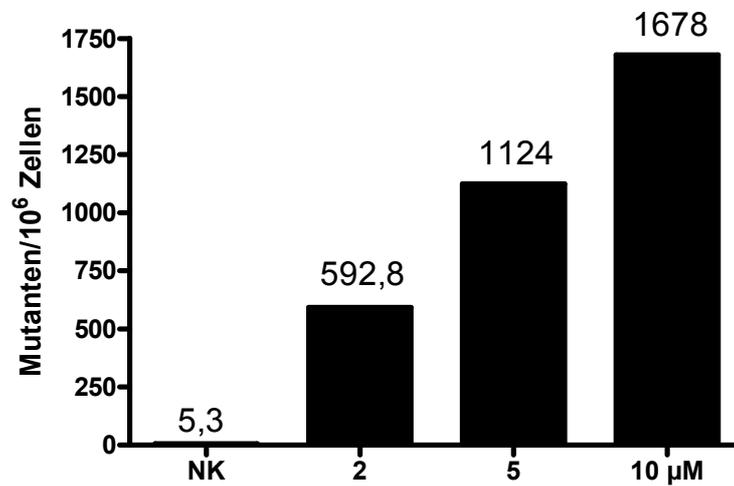


Abb. 57: Mutagenität von MNNG in V79P Zellen, bestimmt mit dem HPRT Assay nach 2 h Inkubation. Negativkontrolle (NK): nur mit DMSO (0,01%) behandelte Zellen; MW (n = 2).

6 Diskussion

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente verfolgten das Ziel, die Rolle einer Metabolisierung durch humane Enzyme für die Toxizität verschiedener PAK und aromatischer Amine am Modell der V79MZ-Zelllinie zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung möglicher Interaktionen der verschiedenen Umweltgifte bei gleichzeitiger Applikation.

6.1 *Diskussion der Methodik*

Viele körpereigene sowie die meisten körperfremden Stoffe müssen im Organismus in wasserlösliche, ausscheidungsfähige Strukturen umgewandelt werden. Die Biotransformation führt zu einer Erhöhung der Polarität und dient der erleichterten Ausscheidung der Substanzen. Bei toxischen Stoffen entstehen jedoch häufig reaktionsfähige Metaboliten, die mit den nukleophilen Stellen von Zellbestandteilen reagieren und diese schädigen können [149]. Die Biotransformation wird in 2 Phasen unterteilt. Die erste Phase stellt eine Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse dar. In der zweiten Phase erfolgt eine Konjugation mit Glukuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Aminosäuren oder Glutathion. Diese Phasen werden von bestimmten Enzymen vermittelt. Viele Erbgut schädigende Substanzen müssen erst durch Enzymsysteme wie Cytochrom P-450 aktiviert werden. Die als Monooxygenasen funktionierenden Cytochrom-P450-Enzyme fügen jeweils ein Sauerstoffatom in ihre Substrate ein. Das Einfügen eines Sauerstoffatoms in Kohlenstoff-Doppelbindungen von polyzyklischen Aromaten unter Entstehung hochreaktiver Epoxide wurde bereits für viele PAK beschrieben, darunter Benzo[a]pyren [67,72]. Hochreaktive Epoxide werden als Auslöser für permanente DNA-Veränderungen und damit als Schlüssel zur Kanzerogenität angesehen. Die metabolische Aktivierung der aromatischen Amine erfolgt über CYP1A2 und hängt von einer initialen N-Hydroxylierung zu Hydroxylaminen ab [86].

6.1.1 **V79 Zellbatterie**

Zur Identifizierung von humanen Cytochrom P450 (CYP) Enzymen, die an der metabolischen Aktivierung der ausgewählten Substanzen beteiligt sind, wurden gentechnisch veränderte Säugerzelllinien verwendet, die verschiedene humane CYP Enzyme (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) und/oder N-Acetyltransferasen (NAT2) stabil exprimieren. Diese Zelllinien basieren auf der Zelllinie V79MZ, die Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters entstammt und keine fremdstoffmetabolisierende CYP-abhängige Aktivität besitzt [110]. Im Gegensatz

zu reinen *in vitro* Experimenten mit isolierten Enzymen lassen sich an der DNA dieser transformierten Zellen, die ähnlich einem intakten Organismus in der Lage sind, Fremdstoffe zu aktivieren, spezifische Addukte, Mutationen, und Strangbrüche von Substanzen, die erwiesenermaßen für Menschen schädlich sind, erzeugen. Dies gilt, wie hier gezeigt, insbesondere für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie DB[a,l]P [78].

Vorteil der CYP-exprimierenden V79-Zellen ist, dass der Beitrag einzelner CYP Enzyms an der Umsetzung bestimmter Substanzen untersucht werden kann und somit anderen Systemen überlegen ist, in denen verschiedene CYP Enzyme nebeneinander vorliegen wie z.B. in Leberzellen [150]. Durch die Untersuchung verschiedener Endpunkte (Cytotoxizität, Mutagenität, DNA-Adduktbildung) in der V79MZ-Testbatterie kann ermittelt werden, ob und welche toxikologisch relevanten Endpunkte einer Chemikalie unter dem Einfluss eines bestimmten CYP Isoenzyms in der Zellkultur hervorgerufen werden.

In vivo-Systeme, wie sie beispielsweise Versuchstiere repräsentieren, sind sehr komplex, haben einen unspezifischen Hintergrund, sind nur eingeschränkt standardisierbar und spielen daher bei der Beantwortung mechanistischer Fragestellungen nur eine untergeordnete Rolle. Demzufolge sind die aus Inhibitions-, Induktions- und *knock-out*-Studien resultierenden Daten oft widersprüchlich und nur bedingt miteinander vergleichbar. Rekombinante *in vitro*-Testsysteme sind dagegen durch eine gute Standardisierbarkeit, hohe Spezifität, niedrige Komplexität und hohe Prädiktivität gekennzeichnet. Dies trifft auch für das V79-Expressionssystem zu [150].

Im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen erlauben V79-Zellen die Untersuchung einer Vielzahl toxikologischer Endpunkte bei niedrigem und stabilem Hintergrund. Sie eignen sich daher besonders für Mutagenitäts- und Toxizitätsstudien [111]. Insbesondere zeichnen sich V79-Zellen gegenüber allen anderen Säugerzelllinien, einschließlich solcher vom Menschen, durch einen außergewöhnlich stabilen, pseudodiploiden Karyotyp mit konstanter Chromosomenzahl aus, der auch nach Transfektion mit Fremd-DNA erhalten werden kann [117]. Dies ist gerade im Hinblick auf cytogenetische Endpunkte entscheidend. V79-Zellen haben darüber hinaus eine sehr kurze Generationszeit von weniger als 12 Stunden und lassen sich mit hoher Klonierungseffizienz stabil transfizieren [118]. Für die Spezifität des Testsystems spricht, dass die hier verwendeten V79-Zellen des sogenannten Mainzer Subklons (V79MZ) weder endogenes Cytochrom P450 [119,120] noch signifikante *N*-Acetyltransferase-Aktivitäten aufweisen [23]. Daher sind sie sowohl für das transfizierte Cytochrom P450-Isoenzym, als auch für die polymorphen Formen der *N*-Acetyltransferase Typ 2 exakt definiert. Glatt et al. [114]

fanden in V79-Zellen zwar Cytochrom-P450-Reduktase- und Epoxidhydrolase-, aber keinerlei Monooxygenaseaktivität. Die Zellen besitzen eine hohe Aktivität von Glutathion-S-Transferasen, aber keinerlei endogene Aktivität von UDP-Glucuronosyltransferasen [115,116] oder Enzymen der SULT-Superfamilie.

Das Modell der Zellbatterie stellt eine Annäherung an den lebenden Organismus dar. Jedoch ist auch die Reaktion der Zellen nicht mit der von Zellen im lebenden Organismus identisch: Zum Beispiel fehlt den Zellen die Gesamtversorgung mit Nährstoffen durch den Organismus. Durch ein spezielles Nährmedium, in dem die Zellen kultiviert werden, versucht man die Lebensbedingungen der Zellen möglichst naturgetreu nachzuahmen.

Auch ist es fraglich, ob der genotoxische Effekt einzelner Schadstoffe auf einzelne Zellen repräsentativ für die Lebens- und Arbeitssituation ist. Die eingesetzten Konzentrationen der Umweltgifte basieren auf Vorversuchen aus unserem Labor und auf anderen Veröffentlichungen [78,151]. Zwar waren die Stoffkonzentrationen höher als die tägliche Belastung mit diesen Substanzen in der Umwelt oder am Arbeitsplatz, dafür war die Exposition von geringerer Dauer. Eine jahrelange Schadstoffbelastung ist bislang nur im Tierversuch möglich.

6.1.2 Comet Assay

Der alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay, kurz Comet Assay, kann zum Nachweis DNA-schädigender Potenziale verschiedener Stoffgruppen herangezogen werden. Er stellt eine Methode zur Darstellung von DNA-Schäden an Einzelzellen dar. Mit dem Comet Assay wird der Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und von Fragmenten, die aus der sogenannten Exzisionsreparatur stammen, ermöglicht [126,127,130].

Erstmals wurde der Comet Assay 1984 von Östling und Johanson beschrieben [152]. Das Verfahren wurde von ihnen herangezogen, um die Migration von DNA von Brustdrüsenzellen nach Bestrahlung beurteilen zu können. Separierte Einzelzellen werden in einem Agarosegel suspendiert und die Kern- und Zellmembranen lysiert. Bei Schädigung des Kerninhaltes und durch Auflösung der Verdrillung (*Supercoiling*) der DNA-Helix werden die durch Strangbrüche gelösten DNA-Fragmente frei. Die Moleküle sind polarisiert und wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Durch anschließende Färbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff kann diese Migration unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Unfragmentierte DNA befindet sich im Kopf der kometenartigen Konfiguration, der Schweif besteht aus Fragmenten. Die Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld weist eine Proportionalität zur induzierten Schädigung auf. Als Nachweis für die Vitalität der Zellen

diente der Trypanblau-Ausschlusstest. Der Comet Assay bot sich als relativ schnell und kostengünstig durchzuführende Methode an, um Erbgut schädigende Wirkungen zu untersuchen.

Allerdings gibt der Comet Assay nur quantitative Aussagen über das Ausmaß der Schädigungen. Eine genaue Lokalisation der Schäden auf einzelne Genorte ist nicht möglich. Hierfür würde sich ein neu entwickeltes Verfahren anbieten, welches die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) mit dem Comet Assay kombiniert [153].

Als quantitatives Maß für DNA-Strangbrüche wurde in der vorliegenden Arbeit das *Olive tail moment* (OTM) gewählt [131], das als Mittelwert aus mindestens 100 Zellen pro Probe, verteilt auf zwei Objektträger, angegeben wird. Andere Verfahren zur Bewertung und Berechnung der DNA-Schädigung haben keine Vorteile gegenüber dem OTM gezeigt [154].

Genotoxische Stoffe sind in der Lage, DNA-Replikationen und genetische Informationen zu verändern. Neben den genotoxischen Schäden kann aber auch Cytotoxizität auftreten. Während bei genotoxischen Effekten, die zu Veränderungen bzw. Schädigungen der DNA führen, die Zelle als solche häufig vital bleibt, führen cytotoxische Effekte häufig zum Zelltod. Hier unterscheidet man zwei Formen: Apoptose und Nekrose. Bei der Apoptose kommt es zum programmierten physiologischen Zelltod durch das allmähliche Erlöschen einzelner Zellfunktionen [155]. Sie ist abzugrenzen von der Zellnekrose, dem provozierten Zelltod, bei dem ein schädigender exogener oder endogener Reiz eine Schrumpfung der Zelle und einen Zerfall des Kerns bewirkt.

Um solche cytotoxischen von genotoxischen Substanzwirkungen im Comet Assay abgrenzen zu können, wurde vor der Lysierung der Zellmembran ein Vitalitätstest (Trypanblau-Ausschlusstest) durchgeführt. Dieser ermöglicht es, den prozentualen Anteil nekrotischer Zellen zu bestimmen. Alle Versuche, bei denen der Anteil vitaler Zellen weniger als 70% betrug, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. Dies sollte ausschließen, dass Anteile des Kometenschweifs im Comet Assay nicht von einer primären DNA-Schädigung, sondern von cytotoxischen Effekt herrührten.

6.2 Diskussion der Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden Stoffe ausgewählt, denen man in der Umwelt oder durch berufliche Exposition vielfach ausgesetzt ist. Es wurden Substanzen aus zwei verschiedenen Stoffklassen gewählt: aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Zahlreiche toxikologische und epidemiologische Untersuchungen haben belegt, dass eine Reihe von umweltrelevanten Substanzen aus diesen beiden Stoffklassen eine zentrale Rolle bei der chemischen Kanzerogenese spielen und ihnen demzufolge eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung von Tumoren zukommen. Andere Substanzen dieser Stoffklassen mit geringfügig veränderter Struktur sind dagegen im Tierversuch nicht kanzerogen, aber in der Umwelt gleichermaßen weit verbreitet. Für die vorliegende Arbeit wurden je zwei Kanzerogene und eine nicht kanzerogene Verbindung der aromatischen Amine und der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe ausgewählt. Dies sollte es ermöglichen, die Spezifität der an humanisierten V79 Zellen verwendeten Testverfahren für die Kanzerogenität der Substanzen zu überprüfen und die Kombinationswirkungen nicht nur zwischen verschiedenen Kanzerogenen, sondern auch zwischen Kanzerogenen und den in der Umwelt in höheren Mengen vorhandenen nicht kanzerogenen Substanzen zu untersuchen.

6.2.1 Aromatische Amine

4-Aminobiphenyl gehört zu den wenigen Substanzen, die als eindeutig krebserzeugend für den Menschen eingestuft werden ([156], <http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthgr01.html>). Es wird in der Leber durch das konstitutive induzierbare Cytochrom P450 1A2 N-hydroxyliert, und in der Blase durch die NAT1 zur ultimalen DNA-bindenden Spezies O-acetyliert. Alternativ wird es in der Leber durch die polymorphe NAT2 entgiftet [44]. Jüngste Befunde zur Toxizität und Kanzerogenität von 4-ABP in *knock-out* Mäusen ohne aktives CYP1A2 haben Zweifel an der Rolle dieses Enzyms bei der Maus geweckt [87,103]. 4-ABP induziert Harnblasentumoren beim Menschen, aber nicht in der Ratte; es wurde von der IARC als Human-kanzerogen eingeordnet. Bei der Bestimmung der Cytotoxizität mit dem MTT Assay ergaben sich nur geringfügig erhöhte Cytotoxizitäten in Zellen mit humanem CYP1A1 und CYP1A2 (Abb. 16). Da alle verwendeten Zelllinien (auch die parentalen Zellen) einen abrupten Abfall des Kurvenverlaufs ab ca. 50 μM zeigen, gibt der MTT-Test folglich keinen Hinweis auf die Beteiligung eines der verwendeten Cytochrome am Metabolismus von 4-ABP. Im Comet Assay reagierten die parentalen Zellen ähnlich wie die V79MZ1A2 Zellen mit einer erhöhten DNA-Migration, die konzentrationsabhängig von 0,3 bis 1 mM zunimmt (Abb. 17; Tabelle 2). In diesem Konzentrationsbereich haben auch Robbiano et al. [106] in Primärkulturen von menschlichen Harnblasenepithelien eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Fragmentierung im Comet Assay mit 4-ABP gesehen. Unsere Ergebnisse zeigen mit der CYP1A2 und NAT2*4 koexprimierenden Zelllinie niedrigere OTM-Werte als mit den Zellen, die nur CYP1A2 exprimieren. Dies spricht für eine Abschwächung der genotoxischen

Wirkung von 4-ABP durch N-Acetylierung und bestätigt das in molekularepidemiologischen Untersuchungen gesehene geringere Harnblasenkrebsrisiko [99,157] und die niedrigere Belastung mit Hämoglobinaddukten [108] in Rauchern, die eine hohe N-Acetylierungskapazität aufweisen, so genannte schnelle Acetylierer. Überraschender Weise wirkt 4-ABP bereits beim Einsatz sehr niedriger Konzentrationen (3,2 nM) ebenfalls leicht genotoxisch, jedoch wieder unabhängig von der Expression von CYP1A2 oder CYP1A1 (Abb. 18; Tabelle 3). Im HPRT-Test wird bei einer Konzentration von 3,2 nM 4-ABP eine signifikant erhöhte Mutationsrate nur bei den parentalen Zellen, nicht aber in V79MZ1A1 und V79MZ1A2 Zellen erreicht (Abb. 19; Tabelle 4). Dies spricht für einen Schutzeffekt durch Metabolisierung von 4-ABP, der in dieser niedrigen Konzentration offensichtlich zum Tragen kommt.

***o*-Toluidin** ist ein monocyclisches aromatisches Amin mit starker kanzerogener Wirkung für die Blase, welches von der WHO (<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthgr02a.html>) wie auch von der DFG [156] in die zweit höchste Stufe als wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen eingestuft wird. Eine Einstufung als Humankanzerogen wird neuerdings vermehrt gefordert [158]. *o*-Tol verursacht bei Ratten Blasentumoren [159]. Die geringfügigen Unterschiede in den ansonsten annähernd parallel verlaufenden Kurven im MTT-Test sprechen nicht für eine spezifische Rolle der Aktivität der exprimierten Cytochrome für die Toxizität von *o*-Tol (Abb. 20; Tabelle 5). Im Comet Assay führte *o*-Tol in einer Konzentration von 3,2 nM zu einer Erhöhung der DNA-Migration, die jedoch bei den parentalen Zellen genauso stark signifikant ist wie in den Zellen, die CYP1A1 oder CYP1A2 exprimieren (Abb. 21; Tabelle 6). Bei höheren Konzentrationen von 0,1 bis 2 mM fällt die Erhöhung der OTM-Werte geringer aus (Abb. 22; Tabelle 7). Es ist wieder ein abschwächender Effekt durch N-Acetylierung in der koexprimierenden Zelllinie gegenüber V79MZ1A2 Zellen zu erkennen. Bei noch höheren Konzentrationen von 5 bis 16 mM kann der in der Literatur für parentale V79 Zellen [141] und humane Harnblasenzellen [106] gezeigte genotoxische Effekt von *o*-Tol bestätigt werden (Abb. 23). Es besteht ein Unterschied zwischen parentalen und CYP1A1- bzw. CYP1A2-exprimierenden Zellen, was für erhöhte Genotoxizität durch Metabolismus sprechen würde. Bei diesen sehr hohen Konzentrationen lassen sich aber unspezifische Effekte, die nicht mit einer genschädigenden Wirkung zusammenhängen, nicht sicher ausschließen. Im HPRT-Test führt 3,2 nM *o*-Tol wie beim 4-ABP nur bei den parentalen Zellen zu einer erhöhten Mutationsrate (Abb. 24). Dieser Effekt wurde durch CYP1A2 vollständig, durch CYP1A1 nur teilweise unterdrückt. Dies spricht auch bei *o*-Tol, wie schon für 4-ABP gesehen, für einen möglichen Schutz vor mutagenen Schäden durch den Metabolismus der aromatischen Amine. In den Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM führt *o*-Tol in V79MZ1A2

Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme an mutierten Zellen, die jedoch im Vergleich zur niedrigen Konzentration von 3,2 nM gering ausfällt (Abb. 25; Tabelle 8).

***m*-Toluidin** ist nicht kanzerogen, bildet aber wie die anderen Isomere der Toluidine Hämoglobinaddukte [108]. Aus der Höhe dieser Addukte lässt sich auf eine nicht unerhebliche Belastung der Umwelt mit *m*-Tol schließen. Seine Rolle in Gemischen von aromatischen Aminen ist noch völlig unbekannt. Der MTT-Test gibt keinen Hinweis auf die Beteiligung eines der verwendeten Cytochrome am Metabolismus von *m*-Tol (Abb. 16). Die Toxizität ist aber vergleichbar mit jener der beiden anderen getesteten aromatischen Amine (Abb. 20 und 26). Auch die Genotoxizität von *m*-Tol ist im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 mM vergleichbar schwach wie jene von *o*-Tol (Abb. 22 und 27). Sie ist den CYP1A2-exprimierenden Zellen etwas stärker, ohne jedoch eine Konzentrationsabhängigkeit zu zeigen. Bei den CYP1A2/ NAT2*4-exprimierenden Zellen wird dieser schwach genotoxische Effekt weitgehend aufgehoben.

6.2.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Pyren ist in Gemischen von PAK quantitativ sehr stark vertreten und wird aus diesem Grund als Leitsubstanz im Biomonitoring verwendet [160,161]. Wie bei den aromatischen Aminen verlaufen die Kurven des MTT-Tests parallel, es sind keine Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien erkennbar (Abb. 28). Oberhalb von 1 µM setzen bei allen Zelllinien cytotoxische Effekte ein. In den Konzentrationen 0,3 und 3,2 µM Pyren sind bei keiner der Zelllinien genotoxische Effekte im Comet Assay ersichtlich (Abb. 29).

Benzo[a]pyren wird von der WHO als wahrscheinlich kanzerogen eingestuft (<http://www.cie.iarc.fr/monoeval/crthgr02a.html>). B[a]P ist ein typisches Beispiel für eine kanzerogene Verbindung, die eine metabolische Aktivierung benötigt [162]. Durch die CYP1A1 katalysierte Oxidation des B[a]P zum 7,8-Oxid wird die Bildung des ultimalen Kanzerogens B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid eingeleitet, welches sich in metabolisch kompetenten V79 Zellen als toxisch erwies [150]. Der MTT-Test zeigt deutlich die Rolle von CYP1A1 an der vom Metabolismus abhängigen Toxizität von B[a]P (Abb. 30; Tabelle 11). Bei einer Konzentration von 0,15 µM wird das Koloniewachstum auf 50% der Kontrollwerte reduziert (EC₅₀). Die anderen Zelllinien (V79P, V79MZ1A2) zeigen in diesem Konzentrationsbereich noch keine bzw. eine geringe Abnahme des Wachstums in CYP1B1-exprimierenden Zellen. Auch der Comet Assay verdeutlicht die Beteiligung von CYP1A1 am Metabolismus von B[a]P, denn die konzentrationsabhängige Steigerung der OTM-Werte nach Inkubation mit 0,1 und 1 µM B[a]P nimmt in der Reihenfolge CYP1B1 < CYP1A2 < 1A1 zu (Abb. 31). Dies stimmt mit den Ergebnis-

sen von Shimada et al. [35] zur Mutagenität im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* exakt überein.

Dibenzo[a,l]pyren wird im Gegensatz zu B[a]P nur als möglicher Weise kanzerogen für den Menschen angesehen (<http://www.cie.iarc.fr/monoeval/crthgr02b.html>), obwohl es im Tierversuch deutlich stärker kanzerogen [163]. Bei Luch et al. [78,79] erwies sich dieser PAK in metabolisch kompetenten V79 Zellen als 100fach toxischer als das ultimale mutagene und kanzerogene B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxid. Der MTT-Test zeigt deutlich die Beteiligung von CYP1A1 und CYP1B1 am Metabolismus von DB[a,l]P (Abb. 32; Tabelle 12). Die EC₅₀-Werte für V79MZ1B1 bzw. V79MZ1A1 entsprechen denen von Mahadevan et al. [143]. In den CYP1A1-exprimierenden Zellen ist die Cytotoxizität von DB[a,l]P mehr als zehnfach stärker als die von B[a]P. Das gleiche gilt für den Comet Assay, bei dem DB[a,l]P die stärkste Wirkung aller untersuchten Substanzen zeigt und bei dem ebenfalls die Rolle von CYP1A1 und CYP1B1 am Metabolismus von DB[a,l]P deutlich wird (Abb. 33; Tabelle 13). Im Konzentrationsbereich von 1 bis 32 nM nehmen die OTM-Werte in den V79MZ1A1 und V79MZ1B1 Zellen, nicht aber den parentalen Zellen, konzentrationsabhängig zu. Auch der HPRT-Test zeigt, dass die starke mutagene Potenz von DB[a,l]P eindeutig von der metabolischen Aktivierung abhängt (Abb. 34; Tabelle 14). Es kommt von 1 bis 32 nM konzentrationsabhängig zu einer steigenden Mutantenzahl, die deutlich über der Spontanmutationsrate liegt.

6.2.3 Kombinationswirkungen

Während die toxikologische Bewertung von Einzelsubstanzen in den vergangenen Jahrzehnten das vorrangige Problem darstellte, wurde man sich zunehmend bewusst, dass es für die toxikologische Bewertung der realen Exposition des Menschen gegenüber Stoffgemischen anderer Konzepte bedarf als jener, die zur toxikologischen Bewertung von Einzelsubstanzen angewendet wurden [164-166].

Der Mensch ist durch Lebensmittel, Umwelt und Arbeitsplatz unterschiedlichen Stoffen ausgesetzt (Chemikalien, Pyrolyseprodukte, Genussmittel, Medikamente, Rückstände in Nahrungsmitteln). Durch die gleichzeitige Einwirkung mehrerer Fremdstoffe kann prinzipiell die Toxizität einzelner Schadstoffe modifiziert werden. Unter diesem Aspekt haben Kombinationswirkungen von Chemikalien für den Menschen große Bedeutung. Ein wirksamer Schutz vor Schäden durch chemische Stoffe setzt voraus, dass insbesondere auch das Gefährdungspotenzial von Schadstoffkombinationen abgeschätzt wird. Im Körper können Kombinationswirkungen, die mit einer erhöhten Toxizität verbunden sind, durch erleichterte Resorption, durch Beeinflussung der Biotransformation infolge veränderter Enzymaktivität (Induktion,

Inhibition) und durch nicht enzymatisch vermittelte Reaktionen (z.B. Nitrosaminbildung im Magen) zustande kommen [167].

Um das Risiko von Stoffkombinationen einschätzen zu können, wurden Untersuchungen in zellulären Systemen durchgeführt. Mit Zellversuchen können jedoch nur Teilaspekte geklärt werden. Zur Untersuchung der besonders relevanten Wirkungen bestimmter in der Umwelt vorkommender Gemische wird man auf Langzeit-Tierversuche nicht verzichten können.

Das dringendste Problem in der Risikoabschätzung von Stoffgemischen besteht darin, zu klären, ob sich die Toxizität des Gemisches von der Summe der Toxizitäten der Einzelsubstanzen unterscheidet, also entweder geringer oder höher ausfällt. Um dies beurteilen zu können, muss geklärt werden, ob die Einzelstoffe in Stoffgemischen untereinander Wechselwirkungen eingehen können oder nicht. Die Art der Wechselwirkung kann grundsätzlich synergistischer oder antagonistischer Art sein oder die einzelnen Stoffe beeinflussen sich weder direkt noch indirekt, d.h. sie verhalten sich so, als wäre jeder nur allein im Körper vorhanden (unabhängige Wirkungen, keine Interferenz). Eine synergistische Wechselwirkung liegt vor, wenn die kombinierte Wirkung zweier oder mehrerer Einzelstoffe größer ist als die bloße Addition der Wirkungen der Einzelstoffe. Antagonistische Effekte treten dann auf, wenn sich die Ausprägung der toxischen Wirkungen der Einzelstoffe in Gemischen gegenseitig behindert, so dass die Summe der Toxizität geringer als die bloße Addition der Wirkungen der Einzelstoffe ist.

Im Folgenden werden die Ergebnisse mit umweltrelevanten Stoffgemischen innerhalb der Klasse der aromatischen Amine bzw. der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe sowie Gemische aus PAK und Arylaminen zusammengefasst und toxikologisch bewertet, um festzustellen, inwieweit z.B. nicht kanzerogene PAK und Arylamine (am Beispiel von Pyren bzw. *m*-Toluidin) als Substanzen in Gemischen die Toxizität von kanzerogenen Verbindungen wie DB[a,l]P beeinflussen.

Zu den Wechselwirkungen zwischen **aromatischen Aminen** finden sich in der Literatur keine vergleichbaren Daten. Sowohl bei der Cytotoxizität, geprüft mit 4-ABP und *m*-Tol (Abb. 35), als auch bei der mit *o*-Tol und *m*-Tol untersuchten Genotoxizität und Mutagenität (Abb. 36 und 37) kommt es z.T. zu einer deutlichen Abschwächung der Wirkung in der Kombination. Gemische von aromatischen Aminen könnten daher ein geringeres Gefahrenpotenzial aufweisen, als man von den Ergebnissen mit einzelnen Substanzen vermuten würde. Diese Ergebnisse bedürfen allerdings einer Überprüfung mit größeren Versuchsansätzen um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

Bei **DB[a,l]P und Pyren** bestätigt sich der große Unterschied in der Cytotoxizität von Pyren und DB[a,l]P (Abb. 38). Ein Kombinationseffekt im Sinne einer deutlichen Abschwächung der Toxizität ist nur bei der Inkubation von Zellen mit CYP1B1 und einem 1000fachen Überschuss von Pyren zu beobachten. Auch auf genotoxischer Ebene wurden Wechselwirkungen zwischen DB[a,l]P und Pyren untersucht: in V79MZ1A1 und V79MZ1B1 Zellen wirkt 3,2 nM DB[a,l]P alleine stark genotoxisch (Abb. 39). Die Genotoxizität von DB[a,l]P wird durch 100 bzw. 1000fachen Überschuss an Pyren konzentrationsabhängig abgeschwächt. Diese Abschwächung der genotoxischen Wirkung stimmt mit Ergebnissen von Binkova und Sram [168] und von Mahadevan et al. [169] überein, die bei Kombinationen von PAK stets geringere DNA-Adduktraten gefunden haben als mit den Einzelsubstanzen. Die antagonistische Interaktion zwischen Pyren und DB[a,l]P könnte auf einer Sättigung der metabolischen Enzyme durch die hohe Pyrenkonzentration beruhen. Dadurch könnte es zu einer geringeren metabolischen Aktivierung von DB[a,l]P kommen [166,170]. Bei längerfristiger Belastung kann der akute Hemmeffekt von PAK-Mischungen auf die Wirkung einzelner Substanzen wie B[a]P oder DB[a,l]P durch Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme abgeschwächt oder sogar umgekehrt werden, d.h. es kommt dann zu einer Steigerung der Toxizität [169]. Solche Effekte lassen sich in V79 Zellen, in denen diese Enzyme nicht induzierbar sind, nicht nachvollziehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen zur Cytotoxizität und Genotoxizität kommt es bei der Mutagenitätsprüfung im HPRT-Test in CYP1A1-exprimierenden Zellen bei Kombination von DB[a,l]P mit 1000fachem Überschuss von Pyren zu einer geringfügigen Steigerung der Mutantenzahl, obwohl Pyren alleine keine mutagene Potenz besitzt (Abb. 40). Bei parental Zellen, die auch mit DB[a,l]P nur eine schwache Mutagenität zeigen, kommt es in Kombination mit Pyren zu einer Abschwächung der Wirkung.

Wechselwirkungen zwischen **aromatischen Aminen und PAK** sind mit den hier verwendeten Methoden bisher nicht untersucht worden. In V79MZ1A1 Zellen geht der cytotoxische Effekt von DB[a,l]P, dessen Cytotoxizität sich um 4 Zehnerpotenzen von den aromatischen Aminen unterscheidet, durch die Gabe von 4-ABP (1+1) völlig verloren (Abb. 41). Dagegen wird die Cytotoxizität von DB[a,l]P durch die gleichzeitige Gabe von *o*-Tol (1+1) sogar leicht gesteigert. Die Cytotoxizität von 4-ABP wird in dem durch die Löslichkeit von Pyren begrenzten Konzentrationsbereich weder mit 100- noch mit 1000fachem Überschuss von Pyren beeinflusst (Abb. 47 und 48). Auf genotoxischer Ebene wird dieser Unterschied zwischen der Wechselwirkung von 4-ABP bzw. *o*-Tol mit DB[a,l]P bei den V79MZ1A1 Zellen nicht beobachtet (Abb. 43). Beide aromatische Amine reduzieren die hohen OTM-Werte, die von DB[a,l]P allein erzeugt werden. Dabei hemmt *o*-Tol sogar noch stärker als 4-ABP. Auch im

HPRT-Test wird die Mutantenzahl von DB[a,l]P in V79MZ1A1 Zellen bereits durch eine äquimolare Konzentration von 4-ABP signifikant herabgesetzt (Abb. 46; Tabelle 19). In V79MZ1B1 Zellen zeigt sich in der Kombination keine wesentliche Beeinflussung der Genotoxizität von DB[a,l]P durch die Zugabe der aromatischen Amine (Abb. 42). In parental und CYP1A2-exprimierenden Zellen (Abb. 44 und 45) bestätigt sich die Notwendigkeit einer metabolischen Aktivierung durch CYP1A1 oder CYP1B1 für Ausprägung der Genotoxizität von DB[a,l]P. In der Kombination mit *o*-Tol und 4-ABP addieren sich diese schwachen Effekte nicht, es kommt zu signifikant geringeren OTM-Werten als durch die Addition zu erwarten wäre (Tabelle 17 und 18). Mit Pyren und 4-ABP wird im HPRT-Test keine Kombinationswirkung gesehen (Abb. 49). Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei gleichzeitiger Belastung mit Umweltgiften aus verschiedenen Substanzklassen mit Wechselwirkungen zu rechnen ist. Diese können sowohl im Sinne einer Abschwächung wie auch der Verstärkung der Einzelwirkungen ausfallen.

6.2.4 Bestimmung von DNA-Addukten durch ³²P-Postlabeling

Die Ergebnisse zur Bestimmung von DNA-Addukten mit Hilfe des ³²P-Postlabeling besitzen nur vorläufigen Charakter. Nach Inkubation von V79MZ1A1 und V79MZ1B1 Zellen mit DB[a,l]P lassen sich deutliche Adduktspots auf den Dünnschichtplatten sichtbar machen (Abb. 53). Dies bestätigt die Ergebnisse mit den anderen Testverfahren und steht im Einklang mit den Vorarbeiten der Gruppen von Baird und Döhmer [78,143,169,171,172]. Dagegen ist bei den aromatischen Aminen nur eine schwache DNA-Adduktbildung nachweisbar, die das kanzerogene Potenzial der verschiedenen Verbindungen nicht widerspiegelt (Abb. 50-53, Tabelle 20).

6.3 *Bewertung des toxikologischen Risikopotenzials von Stoffgemischen in gentechnisch modifizierten V79 Zellen*

Die Untersuchungen ergaben, dass die aromatischen Amine nur zu einem geringen Teil oder überhaupt nicht durch die verwendeten Cytochrome zu cytotoxischen, genotoxischen oder mutagenen Metaboliten aktiviert wurden. Dagegen lassen polyzyklische Kohlenwasserstoffe nach längerer Inkubation über einen Zeitraum von 72 h eine deutliche Abhängigkeit ihrer Wirkung durch Metabolisierung mit humanen CYP1A1 und/oder CYP1B1 erkennen. Auf dieser Ebene sind auch Wechselwirkungen nachweisbar, die in diesen akuten Versuchen überwiegend eine Hemmung durch das nicht kanzerogene Pyren und die aromatischen Amine ergaben. In der Umwelttoxikologie ist die Frage nach Wechselwirkungen in Gemischen von

zentraler Bedeutung. Insbesondere für die Beeinflussung genotoxischer Effekte durch andere nicht genotoxische Substanzen gibt es bislang keine ausreichenden Daten, die auch statistischen Überlegungen standhalten können [165,166]. Die Etablierung komplexer Dosis-Wirkungsbeziehungen ist für die quantitative Risikoabschätzung solcher Interaktionen von großer Bedeutung. Da PAK in der Umwelt fast ausschließlich als Gemisch vorliegen und der kausale Zusammenhang zu einzelnen Verbindungen über epidemiologische Studien nicht hergestellt werden kann, ist die Datenlage zu Wirkungen einzelner PAK auf den Menschen schlecht. Die Bewertung einzelner PAK stützt sich auf die Ergebnisse tierexperimenteller Studien. Es hat sich aber gezeigt, dass hinsichtlich der Aktivierung von PAK durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme große Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstierspezies und nicht zuletzt zum Menschen bestehen [173]. Auch wenn die hier vorgelegten Ergebnisse zu akuten Interaktionen in humanisierten V79 Zellen wertvolle Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen gegeben haben, können sie längerfristige Experimente zur Toxizität und Kanzerogenität von umweltrelevanten Gemischen nicht ersetzen. Eine Risikoabschätzung bezüglich der Umweltbelastung mit 4-ABP und *o*-Toluidin als wichtige Beispiele der aromatischen Amine sowie Benzo[a]pyren und Dibenzo[a,l]pyren aus der Reihe der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe ist deshalb auf Grundlage der Ergebnisse mit den V79 Zellen nicht möglich.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die toxikologische Bewertung von Umweltchemikalien in V79 Zellen des chinesischen Hamsters am Beispiel der beiden kanzerogenen aromatischen Amine 4-Aminobiphenyl und *o*-Toluidin, dem nicht kanzerogenen *m*-Toluidin und den kanzerogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) Benzo[a]pyren und Dibenzo[a,l]-pyren, sowie dem nicht kanzerogenen Pyren, jeweils als Einzelstoffe und in verschiedenen Kombinationen. Zur Identifizierung von humanen Cytochrom P450 Enzymen (CYP), die an der metabolischen Aktivierung der ausgewählten Substanzen beteiligt sind, wurden gentechnisch veränderte V79 Zellen eingesetzt, die verschiedene humane Cytochrome (CYP1A1, CYP1A2 oder CYP1B1) und/oder N-Acetyltransferase 2 (NAT2) stabil exprimieren. Für die Untersuchung der Cytotoxizität wurde der MTT Assay eingesetzt. Die Genotoxizität wurde anhand der im Comet Assay nachweisbaren DNA-Schäden bestimmt. Für die Mutagenitätsuntersuchung wurde der HPRT-Test eingesetzt. Mit Hilfe des ³²P-Postlabelings wurden DNA-Addukte nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen analysiert.

Auf die Cytotoxizität der aromatischen Amine hatte keines verwendeten CYP einen Einfluss. Im Comet Assay reagierten die parentalen Zellen ähnlich wie die CYP1A2-exprimierenden Zellen mit einer erhöhten DNA-Migration, die konzentrationsabhängig von 0,3 bis 1 mM 4-Aminobiphenyl zunimmt. Von 0,1 bis 2 mM *o*-Toluidin sowie 0,1 bis 3 mM *m*-Toluidin kommt es nur in Zellen mit CYP1A1 und CYP1A2, nicht jedoch den parentalen Zellen zu einer leicht erhöhten DNA-Migration, welche durch die N-Acetylierung wieder abgeschwächt wird. 4-Aminobiphenyl wirkt wie *o*-Toluidin in einer Konzentration von 3,2 nM genotoxisch. Dieser Effekt ist jedoch bei den parentalen Zellen genauso stark ausgeprägt wie in den Zellen, die CYP1A1 oder CYP1A2 exprimieren. Im HPRT-Test führten 3,2 nM *o*-Toluidin wie beim 4-Aminobiphenyl nur bei den parentalen Zellen zu einer erhöhten Mutationsrate. Dieser Effekt wurde durch CYP1A2 und CYP1A1 teilweise bis vollständig unterdrückt. Dies spricht für einen möglichen Schutz vor mutagenen Schäden durch Metabolisierung von 4-Aminobiphenyl bzw. *o*-Toluidin. Mit den hier eingesetzten Zelllinien war es nicht möglich, kanzerogene und nicht kanzerogene aromatische Amine zu differenzieren. Keines der untersuchten CYP war wesentlich an der Ausbildung der Toxizität beteiligt. Der bereits bekannte Schutzeffekt durch NAT2 ließ sich teilweise bestätigen. Dies wurde auch in ersten Untersuchungen der DNA-Adduktbildung mit Hilfe des ³²P-Postlabeling bestätigt.

Bei den untersuchten PAK zeigte das nicht kanzerogene Pyren in den eingesetzten Konzentrationen keine von den eingesetzten CYP abhängigen cytotoxischen oder genotoxischen Effekte.

te. Im MTT-Test und im Comet Assay bestätigt sich die Rolle von CYP1A1 an der vom Metabolismus abhängigen Toxizität von Benzo[a]pyren, sowie die Beteiligung von CYP1A1 und CYP1B1 an der metabolischen Aktivierung von Dibenzo[a,l]pyren. Auch der HPRT-Test und das ³²P-Postlabeling zeigen, dass die mutagene Potenz und die DNA-Adduktbildung von Dibenzo[a,l]pyren eindeutig CYP1A1 und CYP1B1 vermittelt werden kann.

Durch gleichzeitige Einwirkung mehrerer Fremdstoffe kam es zu antagonistischen Wirkungen, z.T. jedoch auch zu unabhängigen oder synergistischen Effekten. Die mit den V79 Zellen hier erstmals untersuchte Kombination von aromatischen Aminen mit PAK ergab überwiegend eine starke Hemmung der Cytotoxizität, Genotoxizität und Mutagenität der untersuchten kanzerogenen PAK in den CYP1A1- und CYP1B1-exprimierenden Zellen, die sogar stärker war als die Hemmung durch das nicht kanzerogene Pyren. Die hier beobachteten akuten Effekte in Zellen lassen jedoch keine Vorhersagen zur Toxizität und Kanzerogenität von umweltrelevanten Gemischen nach Langzeitexposition beim Menschen zu.

8 Literaturverzeichnis

1. Becker N Wahrendorf J (1998) Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag
2. Marquardt H Pfau W (2004) Chemische Kanzerogenese. eds: Marquardt H Schäfer S, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
3. Doll R (1996) Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis* 17:177-184
4. Colditz GA Sellers TA Trapido E (2006) Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer* 6:75-83
5. Pott P Hawes L Clark W Collins R (1775) Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum. London:
6. Yamagiva K Ischikawa K (1918) Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res* 3:1-21
7. Miller JA (1970) Carcinogenesis by chemicals: an overview--G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 30:559-576
8. Guengerich FP (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21:345-351
9. Kriek E Rojas M Alexandrov K Bartsch H (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat Res* 400:215-231
10. Talaska G Al Juburi AZSS Kadlubar FF (1991) Smoking related carcinogen-DNA adducts in biopsy samples of human urinary bladder: identification of n-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl as a major adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5350-5354
11. Lin DX Lay JO Bryant MS Malaveille C Friesen M Bartsch H Lang NP Kadlubar FF (1994) Analysis of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human urinary bladder and lung by alkaline hydrolysis and negative ion gas chromatography-mass spectrometry. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.6):11-16
12. Perera FP (1991) Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters. *Environ Health Perspect* 94:231-235
13. Frenkel K (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther* 53:127-166
14. Davis DL Bradlow HL Wolff M Woodruff T Hoel DG Anton-Culver H (1993) Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 101:372-377
15. Goldstein JA Faletto MB (1993) Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 100:169-176

16. Sivapathasundaram S Magnisali P Coldham NG Howells LC Sauer MJ Ioannides C (2001) A study of the expression of the xenobiotic-metabolising cytochrome P450 proteins and of testosterone metabolism in bovine liver. *Biochem Pharmacol* 62:635-645
17. Lewis DFV (1996) *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*. London: Taylor & Francis Ltd
18. Nebert DW (2000) Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics* 10:279-290
19. Stier A (1976) Lipid structure and drug metabolizing enzymes. *Biochem Pharmacol* 25:109-113
20. Monier S Van Luc P Kreibich G Sabatini DD Adesnik M (1988) Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 107:457-470
21. Lewis DF Sheridan G (2001) Cytochromes P450, oxygen, and evolution. *ScientificWorldJournal* 1:151-167
22. Okita RT Masters BSS (1997) *Biotransformations: the cytochromes P450*. Textbook of biochemistry with clinical correlations; pp 981-999; ed.: Devlin TM, New York, Verlag Wiley, New York
23. Scheuenpflug J (2004) *Heterologe Koexpression von humanem Cytochrom P450 1A2 und polymorphen Formen humaner N-Acetyltransferase Typ-2 in V79 Chinesischen Hamsterzellen zur in vitro-Untersuchung von Toxizität und Metabolismus von Chemikalien und Arzneimitteln*. Dissertation aus dem Fachgebiet Lebensmittelchemie der Technischen Universität München
24. Whitlock JP, Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125
25. Shimizu Y Nakatsuru Y Ichinose M Takahashi Y Kume H Mimura J Fujii-Kuriyama Y Ishikawa T (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:779-782
26. Willey JC Coy EL Frampton MW Torres A Apostolakos MJ Hoehn G Schuermann WH Thilly WG Olson DE Hammersley JR Crespi CL Utell MJ (1997) Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:114-124
27. McLemore TL Adelberg S Liu MC McMahon NA Yu SJ Hubbard WC Czerwinski M Wood TG Storeng R Lubet RA . (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 82:1333-1339

28. Le Marchand L Sivaraman L Pierce L Seifried A Lum A Wilkens LR Lau AF (1998) Associations of *CYP1A1*, *GSTM1*, and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 58:4858-4863
29. Schweikl H Taylor JA Kitareewan S Linko P Nagorney D Goldstein JA (1993) Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics* 3:239-249
30. Tassaneeyakul W Birkett DJ Veronese ME McManus ME Tukey RH Quattrochi LC Gelboin HV Miners JO (1993) Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther* 265:401-407
31. Murray GI Melvin WT Greenlee WF Burke MD (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:297-316
32. Baron JM Zwadlo-Klarwasser G Jugert F Hamann W Rubben A Mukhtar H Merk HF (1998) Cytochrome P450 1B1: a major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem Pharmacol* 56:1105-1110
33. Hakkola J Pasanen M Pelkonen O Hukkanen J Evisalmi S Anttila S Rane A Mantyla M Purkunen R Saarikoski S Tooming M Raunio H (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18:391-397
34. Heidel SM MacWilliams PS Baird WM Dashwood WM Buters JT Gonzalez FJ Larsen MC Czuprynski CJ Jefcoate CR (2000) Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res* 60:3454-3460
35. Shimada T Hayes CL Yamazaki H Amin S Hecht SS Guengerich FP Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-2984
36. Shimada T Gillam EM Sutter TR Strickland PT Guengerich FP Yamazaki H (1997) Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos* 25:617-622
37. Nelson DR Koymans L Kamataki T Stegeman JJ Feyereisen R Waxman DJ Waterman MR Gotoh O Coon MJ Estabrook RW Gunsalus IC Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
38. Rendic S Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 29:413-580
39. Lynch AM Murray S Gooderham NJ Boobis AR (1995) Exposure to and activation of dietary heterocyclic amines in humans. *Crit Rev Oncol Hematol* 21:19-31
40. Spaldin V Madden S Adams DA Edwards RJ Davies DS Park BK (1995) Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity *in vitro* - use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab Dispos* 23:929-934

41. Sharer JE Shipley LA Vandenbranden MR Binkley SN Wrighton SA (1995) Comparison of phase I and phase II *in vitro* hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgous monkey. *Drug Metab Dispos* 23:1231-1240
42. Eaton DL Gallagher EP Bammler TK Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5:259-274
43. Beland FA Kadlubar FF (1990) Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*; Ch. 8 pp 267-325; eds: Cooper CS Grover PL, *Handbook exp Pharmacol* IBerlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag
44. Richter E Pfau W (2004) Aromatische Amine, Nitroaromaten und heterozyklische Amine. *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch. 29 pp 731-745; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
45. Kadlubar FF Dooley KL Teitel CH Roberts DW Benson RW Butler MA Bailey JR Young JF Skipper PW Tannenbaum SR (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in Beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Res* 51:4371-4377
46. Badawi AF Hirvonen A Bell DA Lang NP Kadlubar FF (1995) Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res* 55:5230-5237
47. Fuhr U Kummert AL (1995) The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* 58:365-373
48. Weber WW Hein DW (1985) N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 37:25-79
49. Pacifici GM Bencini C Rane A (1986) Acetyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Pharmacology* 32:283-291
50. Stanley LA Coroneos E Cuff R Hickman D Ward A Sim E (1996) Immunochemical detection of arylamine *N*-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J Histochem Cytochem* 44:1059-1067
51. Williams JA Stone EM Fakis G Johnson N Cordell JA Meinl W Glatt H Sim E Phillips DH (2001) *N*-acetyltransferases, sulfotransferases and heterocyclic amine activation in the breast. *Pharmacogenetics* 11:373-388
52. Hickman D Pope J Patil SD Fakis G Smelt V Stanley LA Payton M Unadkat JD Sim E (1998) Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. *Gut* 42:402-409
53. Ohsako S Deguchi T (1990) Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine *N*-acetyltransferases from human liver. *J Biol Chem* 265:4630-4634

54. Grant DM Hughes NC Janezic SA Goodfellow GH Chen HJ Gaedigk A Yu VL Grewal R (1997) Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res* 376:61-70
55. Minchin RF Ilett KF Teitel CH Reeves PT Kadlubar FF (1992) Direct O-acetylation of N-Hydroxy arylamines by acetylsalicylic acid to form carcinogen- DNA adducts. *Carcinogenesis* 13:663-667
56. Minchin RF Reeves PT Teitel CH McManus ME Mojarrabi B Ilett KF Kadlubar FF (1992) N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amines by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in ICOS-1I cells. *Biochem Biophys Res Commun* 185:839-844
57. Hein DW Doll MA Rustan TD Gray K Feng Y Ferguson RJ Grant DM (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 14:1633-1638
58. Thompson PA Seyedi F Lang NP MacLeod SL Wogan GN Anderson KE Tang Y-M Coles B Kadlubar FF (1999) Comparison of DNA adduct levels associated with exogenous and endogenous exposures in human pancreas in relation to metabolic genotype. *Mutat Res* 424:263-274
59. Evans DA (1989) N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* 42:157-234
60. Yu MC Skipper PL Taghizadeh K Tannenbaum SR Chan KK Henderson BE Ross RK (1994) Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst* 86:712-716
61. Cartwright RA Glashan RW Rogers HJ Ahmad RA Barham-Hall D Higgins E Kahn MA (1982) Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 2:842-845
62. Golka K Prior V Blaszkewicz M Bolt HM (2002) The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett* 128:229-241
63. Vineis P Marinelli D Autrup H Brockmüller J Cascorbi I Daly AK Golka K Okkels H Risch A Rothman N Sim E Taioli E (2001) Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1249-1252
64. Koss G (2004) Kohlenwasserstoffe. *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch. 24 pp 579-621; eds: Marquardt H Schäfer S, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
65. Stumkat L (2004) Interaktion zwischen Metabolismus und Transport von Pyren in Caco-2-Zellen als Modell der gastrointestinalen Barriere. *Dissertation, Hannover, Tierärztliche Hochschule*
66. Alexandrov K Rojas M Kadlubar FF Lang NP Bartsch H (1996) Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis* 17:2081-2083

67. DePierre JW Ernster L (1978) The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. *Biochim Biophys Acta* 473:149-186
68. Yang SK McCourt DW Leutz JC Gelboin HV (1977) Benzo[a]pyrene diol epoxides: mechanism of enzymatic formation and optically active intermediates. *Science* 196:1199-1201
69. de Waziers I Cugnenc PH Yang CS Leroux JP Beaune PH (1990) Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 253:387-394
70. Fromme H Lahrz T Piloty M Oddoy A (2005) Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in der Innenraumluft von Wohnungen, Kindergärten und Schulen. *Umweltmed Forsch Prax* 10:35-41
71. Armstrong B Hutchinson E Unwin J Fletcher T (2004) Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 112:970-978
72. Conney AH (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42:4875-4917
73. Koreeda M Moore PD Wislocki PG Levin W Yagi H Jerina DM (1978) Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA, and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science* 199:778-781
74. Hu Z Wells PG (1992) In vitro and in vivo biotransformation and covalent binding of benzo(a)pyrene in Gunn and RHA rats with a genetic deficiency in bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 263:334-342
75. Thakker DR Yagi H Lu AY Levin W Conney AH (1976) Metabolism of benzo[a]pyrene: conversion of (+/-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to highly mutagenic 7,8-diol-9,10-epoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3381-3385
76. Buening MK Wislocki PG Levin W Yagi H Thakker DR Akagi H Koreeda M Jerina DM Conney AH (1978) Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5358-5361
77. Kim JH Stansbury KH Walker NJ Trush MA Strickland PT Sutter TR (1998) Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19:1847-1853
78. Luch A Coffing SL Tang YM Schneider A Soballa V Greim H Jefcoate CR Seidel A Greenlee WF Baird WM Doehmer J (1998) Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene. *Chem Res Toxicol* 11:686-695
79. Luch A Schober W Soballa VJ Raab G Greim H Jacob J Doehmer J Seidel A (1999) Metabolic activation of dibenzo[a,l]pyrene by human cytochrome P450 1A1 and P450 1B1 expressed in V79 Chinese hamster cells. *Chem Res Toxicol* 12:353-364

80. McCann J Choi E Yamasaki E Ames BN (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc Natl Acad Sci U S A 72:5135-5139
81. Harper KH (1958) The intermediary metabolism of pyrene. Br J Cancer 12:116-120
82. Richter E Rösler S Scherer G Gostomzyk JG Grübl A Krämer U Behrendt H (2001) Haemoglobin adducts from aromatic amines in children, in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke. Int Arch Occup Environ Health 74:421-428
83. Richter E Rösler S Becker A (2000) Effect of diet on haemoglobin adducts from 4-aminobiphenyl in rats. Arch Toxicol 74:203-206
84. Gan J Skipper PL Gago-Dominguez M Arakawa K Ross RK Yu MC Tannenbaum SR (2004) Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. J Natl Cancer Inst 96:1425-1431
85. Platzek T Lang C Grohmann G Gi U-S Baltes W (1999) Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria *in vitro*. Hum Exp Toxicol 18:552-559
86. Guengerich FP Shimada T (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. Chem Res Toxicol 4:391-407
87. Kimura S Kawabe M Ward JM Morishima H Kadlubar FF Hammons GJ Fernandez-Salguero P Gonzalez FJ (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice. Carcinogenesis 20:1825-1830
88. Bryant MS Skipper PL Tannenbaum SR Maclure M (1987) Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. Cancer Res 47:602-608
89. Forth W Henschler D Rummel W Starke K (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag
90. Bell DA Badawi AF Lang NP Ilett KF Kadlubar FF Hirvonen A (1995) Polymorphism in the *N*-acetyltransferase 1 (NAT1) polyadenylation signal: association of NAT1*10 allele with higher *N*-acetylation activity in bladder and colon tissue. Cancer Res 55:5226-5229
91. Sadrieh N Davis CD Snyderwine EG (1996) *N*-Acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. Cancer Res 56:2683-2687
92. Lang NP Kadlubar FF (1991) Aromatic and heterocyclic amine metabolism and phenotyping in humans. New Horizons in Biological Dosimetry 372:33-47
93. Kadlubar FF Butler MA Kaderlik KR Chou HC Lang NP (1992) Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. Environ Health Perspect 98:69-74

94. Vineis P Caporaso N Tannenbaum SR Skipper PL Glogowski J Bartsch H Coda M Talaska G Kadlubar F (1990) Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Res* 50:3002-3004
95. Bartsch H Caporaso N Coda M Kadlubar F Malaveille C Skipper P Talaska G Tannenbaum SR Vineis P (1990) Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in active and passive cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst* 82:1826-1831
96. Vineis P Ronco G (1992) Interindividual variation in carcinogen metabolism and bladder cancer risk. *Environ Health Perspect* 98:95-99
97. Vineis P Bartsch H Caporaso N Harrington AM Kadlubar FF Landi MT Malaveille C Shields PG Skipper P Talaska G Tannenbaum SR (1994) Genetically based N-acetyltransferase metabolic polymorphism and low level environmental exposure to carcinogens. *Nature* 369:154-156
98. Turesky RJ Lang NP Butler MA Teitel CH Kadlubar FF (1991) Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 12:1839-1845
99. Cascorbi I Roots I Brockmüller J (2001) Association of *NAT1* and *NAT2* polymorphisms to urinary bladder cancer: Significantly reduced risk in subjects with *NAT1*10*. *Cancer Res* 61:5051-5056
100. Shimada T Yamazaki H Mimura M Inui Y Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414-423
101. Branner B Kutzer C Zwickenpflug W Scherer G Heller W-D Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and non-smoking women. *Biomarkers* 3:35-47
102. Sabbioni G Richter E (1999) Aromatic amines, nitroarenes, and heterocyclic amines. *Toxicology*; Ch. 30 pp 729-174; eds: Marquardt H Schäfer SG McClellan R Welch F, San Diego, CA, USA, Academic Press
103. Shertzer HG Dalton TP Talaska G Nebert DW (2002) Decrease in 4-aminobiphenyl-induced methemoglobinemia in *Cyp1a2(-/-)* knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 181:32-37
104. Martin FL Cole KJ Orme MH Grover PL Phillips DH Venitt S (1999) The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutat Res* 445:21-43
105. Martin FL Cole KJ Williams JA Millar BC Harvey D Weaver G Grover PL Phillips DH (2000) Activation of genotoxins to DNA-damaging species in exfoliated breast milk cells. *Mutat Res* 470:115-124

106. Robbiano L Carrozzino R Bacigalupo M Corbu C Brambilla G (2002) Correlation between induction of DNA fragmentation in urinary bladder cells from rats and humans and tissue-specific carcinogenic activity. *Toxicology* 179:115-128
107. DeBord DG Swearengen TF Cheever KL Booth-Jones AD Wissinger LA (1992) Binding characteristics of ortho-toluidine to rat hemoglobin and albumin. *Arch Toxicol* 66:231-236
108. Richter E Branner B (2002) Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J Chromatogr B* 778:49-62
109. Ford DK Yerganian G (1958) Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 21:393-425
110. Doehmer J (1993) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology* 82:105-118
111. Bradley MO Bhuyan B Francis MC Langenbach R Peterson A Huberman E (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87:81-142
112. Sawada M Kamataki T (1998) Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutat Res* 411:19-43
113. Glatt H Gemperlein I Turchi G Heinritz H Doehmer J Oesch F (1987) Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol* 1:313-334
114. Glatt H Gemperlein I Setiabudi F Platt KL Oesch F (1990) Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5:241-249
115. Ebner T Burchell B (1993) Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family. *Drug Metab Dispos* 21:50-55
116. Ouzzine M Pillot T Fournel-Gigleux S Magdalou J Burchell B Siest G (1994) Expression and role of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 310:196-204
117. Simi S Xiao Y Campagna M Doehmer J Darroudi F (1999) Dual-colour FISH analysis to characterize a marker chromosome in cytochrome P450 2B1 recombinant V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 14:57-61
118. Doehmer J Dogra S Friedberg T Monier S Adesnik M Glatt H Oesch F (1988) Stable expression of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5769-5773
119. Onderwater RC Goeptar AR Levering PR Vos RM Konings PN Doehmer J Commandeur JN Vermeulen NP (1996) The use of macroporous microcarriers for the large-scale growth of V79 cells genetically designed to express single human

- cytochrome P450 isoenzymes and for the characterization of the expressed cytochrome P450. *Protein Expr Purif* 8:439-446
120. Krebsfaenger N Murdter TE Zanger UM Eichelbaum MF Doehmer J (2003) V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans. *ALTEX* 20:143-154
 121. Krenitsky TA Papaioannou R Elion GB (1969) Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. *J Biol Chem* 244:1263-1270
 122. Krenitsky TA Papaioannou R (1969) Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. II. Kinetics and chemical modification. *J Biol Chem* 244:1271-1277
 123. Fenwick RG, Jr. (1980) Reversion of a mutation affecting the molecular weight of HGPRT: intragenic suppression and localization of X-linked genes. *Somatic Cell Genet* 6:477-494
 124. Francke U Taggart RT (1980) Comparative gene mapping: order of loci on the X chromosome is different in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:3595-3599
 125. Greim H Deml E (1996) *Toxikologie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner.* VCH, Weinheim
 126. Collins AR Dobson VL Dusinská M Kennedy G Stetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375:183-193
 127. Faust F Kassie F Knasmüller S Boedecker RH Mann M Mersch-Sundermann V (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566:209-229
 128. Singh NP McCoy MT Tice RR Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191
 129. Tice RR Andrews PW Singh NP (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 53:291-301
 130. Speit G Hartmann A (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555-559
 131. Olive PL Durand RE Le Riche J Olivotto IA Jackson SM (1993) Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res* 53:733-736
 132. Speit G Dennog G (2002) *Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von oxidativem Streß. Projekt Umwelt und Gesundheit des Landes Baden-Württemberg*
 133. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053-1074

134. Reddy MV Gupta RC Randerath K (1981) 32P-base analysis of DNA. *Anal Biochem* 117:271-279
135. Gupta RC Reddy MV Randerath K (1982) 32P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen--DNA adducts. *Carcinogenesis* 3:1081-1092
136. Gupta RC Earley K (1988) 32P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* 9:1687-1693
137. Phillips DH (1997) Detection of DNA modifications by the ³²P-postlabelling assay. *Mutat Res* 378:1-12
138. Tice RR Agurell E Anderson D Burlinson B Hartmann A Kobayashi H Miyamae Y Rojas E Ryu JC Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221
139. Gupta RC (1985) Enhanced sensitivity of 32P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen:DNA adducts. *Cancer Res* 45:5656-5662
140. Spencer GG Beach AC Gupta RC (1993) Improved thin-layer chromatographic separation of 32P-postlabeled DNA adducts. *J Chromatogr* 612:295-301
141. Hartmann A Kiskinis E Fjallman A Suter W (2001) Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat Res* 497:199-212
142. Lautraite S Musonda AC Doehmer J Edwards GO Chipman JK (2002) Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis* 17:45-53
143. Mahadevan B Dashwood W-M Luch A Pecaj A Doehmer J Seidel A Pereira C Baird WM (2003) Mutations induced by (-)-*anti*-11R,12*S*-dihydrodiol 13*S*,14*R*-epoxide of dibenzo[*a,l*]pyrene in the coding region of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) gene in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 41:131-139
144. Ricicki EM Soglia JR Teitel C Kane R Kadlubar F Vouros P (2005) Detection and quantification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl adducts in human pancreas tissue using capillary liquid chromatography-microelectrospray mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 18:692-699
145. Köhl W Eisenbrand G (2004) *N*-Nitrosoverbindungen. *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch. 30 pp 747-762; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
146. Taniguchi E Nakajima H Hongyo T Fukuda K Li LY Kurooka M Matsuda H Nomura T (2002) Effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine on the human colorectal polyps consecutively maintained in SCID mice. *Cancer Lett* 182:127-133
147. Rehman I Lowry DT Adams C Abdel-Fattah R Holly A Yuspa SH Hennings H (2000) Frequent codon 12 *Ki-ras* mutations in mouse skin tumors initiated by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and promoted by mezerein. *Mol Carcinog* 27:298-307

148. Dunkern T Roos W Kaina B (2003) Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related. *Mutat Res* 544:167-172
149. Eisenbrand G Metzler M (1994) *Toxikologie für Chemiker*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
150. Doehmer J Buters J Luch A Soballa V Baird WM Morisson H Stegeman JJ Townsend AJ Greenlee WF Glatt HR Seidel A Jacob J Greim H (1999) Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metab Rev* 31:423-435
151. Kleinsasser NH Wallner BC Kastenbauer ER Muenzenrieder RK Harréus UA (2000) Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat Res* 467:21-30
152. Östling O Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298
153. Harréus UA Kleinsasser NH Zieger S Wallner B Reiter M Schuller P Berghaus A (2004) Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 563:131-138
154. Lee E Oh E Lee J Sul D Lee J (2004) Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci* 81:121-132
155. Loro L Vintermyr OK Johannessen AC (2005) Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral Dis* 11:274-287
156. Anon (2005) MAK- und BAT-Wert-Liste. Mitteilung 41 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2005; Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69451 Weinheim, Germany
157. Gu J Liang D Wang Y Lu C Wu X (2005) Effects of *N*-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res* 581:97-104
158. Markowitz SB Levin K (2004) Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. *J Occup Environ Med* 46:154-160
159. Ashby J Paton D (1993) The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mutat Res* 286:3-74
160. Popp W Vahrenholz C Schell C Grimmer G Dettbarn G Kraus R Brauksiepe A Schmeling B Gutzeit T von Bülow J Norpoth K (1997) DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup Environ Med* 54:176-183
161. Murphy SE Link CA Jensen J Le C Puumala SS Hecht SS Carmella SG Losey L Hatsukami DK (2004) A comparison of urinary biomarkers of tobacco and carcinogen exposure in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1617-1623

162. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Rev Cancer* 3:733-744
163. Cavalieri EL Higginbotham S RamaKrishna NV Devanesan PD Todorovic R Rogan EG Salmasi S (1991) Comparative dose-response tumorigenicity studies of dibenzo[a,l]pyrene versus 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, benzo[a]pyrene and two dibenzo[a,l]pyrene dihydrodiols in mouse skin and rat mammary gland. *Carcinogenesis* 12:1939-1944
164. Musafia-Jeknic T Mahadevan B Pereira C Baird WM (2005) Long-term effects of a standardized complex mixture of urban dust particulate on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Toxicol Sci* 88:358-366
165. Mahadevan B Parsons H Musafia T Sharma AK Amin S Pereira C Baird WM (2004) Effect of artificial mixtures of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons present in coal tar, urban dust, and diesel exhaust particulates on MCF-7 cells in culture. *Environ Mol Mutagen* 44:99-107
166. White PA (2002) The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res* 515:85-98
167. Renwick AG Barlow SM Hertz-Picciotto I Boobis AR Dybing E Edler L Eisenbrand G Greig JB Kleiner J Lambe J Müller DJG Smith MR Tritscher A Tuijtelars S van den Brandt PA Walker R Kroes R (2003) Risk characterisation of chemicals in food and diet. *Food Chem Toxicol* 41:1211-1271
168. Binková B Srám RJ (2004) The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res* 547:109-121
169. Mahadevan B Marstont CP Dashwood W-M Li Y Pereira C Baird WM (2005) Effect of a standardized complex mixture derived from coal tar on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Chem Res Toxicol* 18:224-231
170. Swenberg JA La DK Scheller NA Wu KY (1995) Dose-response relationships for carcinogens. *Toxicol Lett* 82-83:751-756
171. Ralston SL Seidel A Luch A Platt KL Baird WM (1995) Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene to (-)-anti(11R, 12S,13S,14R)- and (+)-syn(11S,12R,13S,14R)11,12-diol-13,14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 16:2899-2907
172. Melendez-Colon VJ Smith CA Seidel A Luch A Platt KL Baird WM (1997) Formation of stable adducts and absence of depurinating DNA adducts in cells and DNA treated with the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene or its diol epoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13542-13547
173. Jacob J Raab G Soballa VJ Luch A Grimmer G Greim H Doehmer J Morrison HG Stegeman JJ Seidel A (1999) Species-dependent metabolism of benzo[c]phenanthrene

and dibenzo[*a,l*]pyrene by various CYP450 isoforms. Polycycl Arom Compds 16:191-203

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die jederzeit vorhandene Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem kommissarischen Vorstand des Institutes, Herrn Professor Dr. P. Eyer, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Besonders danke ich meiner Kollegin, S. Vogt, ohne deren große Hilfe und Zusammenarbeit die Durchführung dieser Arbeit fast unmöglich gewesen wäre.

Einen Dank auch an meine Kollegen Dr. M. Maier, K. Gaber, C. Oehlmann und dem gesamten Arbeitskreis für die freundlich-entspannte Atmosphäre im Labor.

Herrn Dr. J. Scheuenpflug von GenPharmTox danke ich dafür, dass er mir trotz seiner Arbeitsbelastung mit hilfreichen Ratschlägen immer wieder zur Seite stand.

Der größte Dank gilt meiner Familie, ganz besonders natürlich meinen Eltern und meinem Freund Jörg, die mir stets helfend zur Seite standen und mich immer liebevoll begleitet haben.

Diese Arbeit wurde vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert.

Lebenslauf

Name		Fuchs
Vorname		Katharina
Geboren am	04.07.1978	in Regensburg
<u>Schule:</u>	1984-1988	Von-der-Tann-Volksschule (Grundschule), Regensburg
	1988-1997	St. Marien-Gymnasium der Diözese Regensburg Beendet mit Allgemeiner Hochschulreife
<u>Studium:</u>	1997-1999	Grundstudium Diplom Biologie an der Universität Regensburg
	12.10.1999	Vordiplom in Biologie, Chemie und Physik
	1999-2001	Hauptstudium Diplom Biologie an der Universität Regensburg
	Juli 2001	Diplomprüfung
	08/01-07/02:	Diplomarbeit am Lehrstuhl Genetik
<u>Berufliche Tätigkeit:</u>	08/02-12/02:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg
	2002-2003	Anstellung als Diplom Biologin bei Genedia Molekularbiologische Begutachtung GmbH (Humangenetik), München
<u>Promotion:</u>	seit 06/03	Anfertigen einer Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Richter am Walther Straub- Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München