Unterschiedliche Biotransformation von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bei Tier und Mensch als Basis für verschiedene biologische Wirksamkeit

vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Lebensmittelchemiker

Matthias Baum

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.7.1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 1995 und Juli 1998 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Anregungen und wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Ernst möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Für Ute,

Johanna, Karolina und Franziska

Abkürzungen

α-NF	α-Naphthoflavon
^{3}H	Tritium
Abb.	Abbildung
B[*a*]P	Benzo[*a*]pyren
B[*a*]P-7,8-DH	Benzo[*a*]pyren-7,8-Dihydrodiol
B[*c*]PH	Benz[*c*]phenanthren
B[*c*]PH-3,4-DH	Benzo[*c*]phenanthren-3,4-Dihydrodiol
B[*c*]PH-5,6-DH	Benzo[*c*]phenanthren-5,6-Dihydrodiol
B[*j*]F	Benzo[*j*]fluoranthen
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
CYP 450	Cytochrom P450
DB[*a,l*]P	Dibenzo[*a,l*]pyren
DB[*a,l*]P-11,12-DH	Dibenzo[*a,l*]pyren-11,12-Dihydrodiol
DB[*a,l*]P-8,9-DH	Dibenzo[*a,l*]pyren-8,9-Dihydrodiol
DH	Dihydrodiol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
FKS	Fötales Kälberserum
FLU	Fluoranthen
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glucuronyl-Transferase
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
i.p.	intraperitoneal
max	maximal
min	Minute

n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
n.e.	nicht-enzymatisch
NADPH	β-Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NKS	Natales Kälberserum
O-NPG	O-Nitrophenyl-ß-D-Galaktopyranosid
OR	Oxidoreductase
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
ppb	1 in 10^9
RP	Umkehrphase
RPM	Umdrehungen pro Minute
S.typh	*Salmonella typhimurium*
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST	Sulfotransferase
TPA	Tetradecanoyl-13-acetat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Trol	Troleandomycin
UV	Ultraviolett
V79	Lungenfibroblasten des männlichen syrischen Hamsters
7,12-DiMe-B[*a*]A-3,4-DH	7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen-3,4-Dihydrodiol
B[*a*]P-7,8-DH	Benzo[*a*]pyren-7,8-Dihydrodiol
B[b]F-9,10-DH	Benzo[*b*]fluoranthen-9,10-Dihydrodiol
5-MeCHR	5-Methylchrysen
AfB_1	Aflatoxin B_1

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese 1

1.2 Fremdstoffmetabolismus 3

1.3 Cytochrom P450-abhängige Monoxygenasen 3

1.3.1 Nomenklatur 3

1.3.2 Funktion, Lokalisation und Reaktionszyklus 4

1.3.3 CYP 450-Isoformen 6

1.4 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe 8

1.4.1 Definition und Eigenschaften 8

1.4.2 Nomenklatur 8

1.4.3 Entstehung 9

1.4.4 Industrielle Bedeutung von PAK 10

1.4.5 PAK in Lebensmitteln 10

1.4.6 Kanzerogenität von PAK 12

1.4.7 Exposition des Menschen mit PAK 12

1.4.8 Kinetisches Verhalten vom PAK im Organismus 13

1.4.9 Metabolismus von PAK 13

1.4.10 Struktur-Wirkungsbeziehungen von PAK 17

1.4.11 Übertragung von Kanzerogenitätsstudien am Tier auf den Menschen 17

2 Theoretische Grundlagen 19

2.1 Benzo[*c*]phenanthren 19

2.1.1 Vorkommen 19

2.1.2 Biologische Aktivität 20

2.1.3 Metabolismus beim Tier 22

2.1.4 Metabolismus beim Menschen 23

2.2 Dibenzo[*a,l*]pyren 24

2.2.1 Vorkommen 24

2.2.2 Biologische Aktivität 24

2.2.3 Metabolismus 25

2.3 Fluoranthen 26

2.3.1 Vorkommen 26

2.3.2 Biologische Aktivität 27

2.3.3 Metabolismus 27

2.4 Benzo[*j*]fluoranthen 28

2.4.1 Vorkommen 28

2.4.2 Biologische Aktivität 29

2.4.3 Metabolismus 29

2.5 Humane CYP 450-Enzyme 31

2.5.1 CYP 1A-Isoenzyme 32

2.5.2 CYP 3A-Isoenzyme 33

2.5.3 CYP 1B1 34

2.5.4 Weitere CYP 450-Isoenzyme der menschlichen Leber: CYP 2A6, 2C19, 2D6 und 2E1 35

2.5.5 Bestimmung einzelner Isoenzymaktivitäten 36

2.6 *In vitro*-Testsysteme 38

2.6.1 Rekombinante humane CYP 450-Isoenzyme 38

2.6.2 Bestimmung von Genotoxizität und Mutagenität 38

2.6.2.1 Die SOS-Reparaturenzymkaskade in Prokaryoten 38

2.6.2.2 Bestimmung der Xenobiotika-induzierten Genotoxizität in gentechnisch modifizierten *Salmonella typhimurium*-Stämmen 40

2.6.3 Bestimmung von HPRT-Vorwärtsmutationen in V79-Zellen 41

2.6.3.1 V79 h3A4 hOR-Zellen 41

2.6.3.2 HPRT-Genmutationstest 42

3 Problemstellung 43

4 Ergebnisse und Diskussion 46

4.1 B[*c*]PH-Metabolismus mit CYP 450-Enzymen 46

4.1.1 Methodenentwicklung zur HPLC-chromatographischen Trennung der B[*c*]PH-Metaboliten 46

4.1.2 Charakterisierung der [G-^{3}H] B[*c*]PH-Stammlösung 46

4.1.2.1 Aufreinigung 46

4.1.2.2 Konzentration und spezifische Aktivität 48

4.1.3 Charakterisierung der Mikrosomen 49

4.1.3.1 Tierische Mikrosomen 49

4.1.3.2 Humane Lebermikrosomen 50

4.1.4 Metabolismus von B[*c*]PH 50

4.1.4.1 Metabolismus von B[*c*]PH in tierischen Lebermikrosomen 51

4.1.4.1.1 B[*c*]PH-Metabolismus in Schweinelebermikrosomen 51

4.1.4.1.2 Zeitabhängigkeit des B[*c*]PH-Metabolismus in Schweinelebermikrosomen 51

4.1.4.1.3 B[*c*]PH-Metabolismus in Rinderlebermikrosomen 52

4.1.4.1.4 B[*c*]PH-Metabolismus in Rattenlebermikrosomen 53

4.1.4.2 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Lebermikrosomen 56

4.1.4.3 Speziesabhängigkeit des B[*c*]PH-Metabolismus 60

4.1.4.4 Beteiligung von humanen CYP 450-Isoenzymen an der Aktivierung von B[*c*]PH 61

4.1.4.4.1 Korrelationsstudien 61

4.1.4.4.1.1 Charakterisierung der CYP 450 Isoenzymaktivitäten der Mikrosomen 61

4.1.4.4.1.1.1 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität 62

4.1.4.4.1.1.2 CYP 450-Isoenzym-spezifische Aktivitäten der humanen Lebermikrosomen 63

4.1.4.4.1.3 Korrelationen zwischen CYP 450-Isoenzym-spezifischen Markeraktivitäten und B[*c*]PH-Metaboliten 64

4.1.4.4.2 CYP 450-spezifische Inhibitoren 65

4.1.4.4.2 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen, rekombinanten CYP 450-Enzymen 68

4.1.4.5 Zusammenfassende Betrachtung von Korrelationsstudien, Inhibitorstudien und Inkubationen von rekombinanten CYP 450-Isoenzymen 70

4.1.3.5 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Lungenmikrosomen 72

4.2 Genotoxizität und Mutagenität von PAK-Dihydrodiolen nach Aktivierung mit humanen CYP 450-Isoenzymen 74

4.2.1 Bestimmung der Genotoxizität durch Induktion der SOS-Reparaturenzym-Kaskade in *S. typh* TA 1535 pSK 1002 75

4.2.1.1 Optimierung der *umu*-Testbedingungen 75

4.2.1.2 Aktivierung von PAH-Dihydrodiolen mit Humanlebermikrosomen 75

4.2.1.2.1 Benzo[*a*]pyren-7,8-Dihydrodiol 76

4.2.1.2.2 Benzo[*c*]phenanthren-3,4-Dihydrodiol und Benzo[*c*]phenanthren-5,6-Dihydrodiol 77

4.2.1.2.3 Dibenzo[*a,l*]pyren-11,12-Dihydrodiol 79

4.2.1.2.4 Fluoranthen-2,3-Dihydrodiol und Benzo[*j*]fluoranthen-9,10-Dihydrodiol 80

4.2.1.3 Beteiligung von CYP 450-Isoenzymen an der Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH 81

4.2.1.3.1 Korrelation der induzierten *umu*-Aktivitäten mit CYP 450-spezifischen Aktivitäten 81

4.2.1.3.2 Inhibitorstudien 82

4.2.1.3.3 PAK-Dihydrodiol-Aktivierung durch rekombinante humane CYP 450-Isoformen 83

4.2.1.3.4 Zusammenfassende Betrachtung von Korrelationsstudien, Inhibitorstudien und Inkubationen mit rekombinanten humanen CYP 450-Enzymen 84

4.2.2 Mutagenität der PAK-Dihydrodiole: Bestimmung der HPRT-Vorwärts-Mutationen in V79 h3A4 OR-Zellen 86

4.2.2.1 Mutagenität 86

4.2.2.2 Cytotoxizität von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH 88

4.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der *umu*-Genotoxizitätstests und HPRT-Mutagenitätstests 89

5 Zusammenfassung 91

6 Material und Methoden 94

6.1 Geräte 94

6.2 Verbrauchsmaterial 95

6.3 Chemikalien 95

6.4 Mikrosomen 97

6.4.1 Humane Leber- und Lungenproben 97

6.4.1.1 Herstellung der humanen Leber- und Lungenmikrosomen 97

6.4.2 Tierische Lebermikrosomen 98

6.4.2.1 Herstellung von Schweineleber- und Rinderlebermikrosomen 98

6.4.2.2 Herstellung von Rattenlebermikrosomen 99

6.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes der Lebermikrosomen 100

6.4.4 Quantitative Bestimmung des CYP 450 und Cytochrom b_5-Gehaltes 100

6.4.5 Bestimmung der CYP 450-Isoenzymaktivitäten 102

6.4.5.1 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität 102

6.4.5.2 Bestimmung der übrigen CYP 450-Isoenzym-spezifischen Aktivitäten 104

6.5 Rekombinante CYP 450-Enzyme 104

6.6 Metabolismus von B[*c*]PH 104

6.6.1 Charakterisierung der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung 104

6.6.1.1 Aufreinigung der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung 104

6.6.1.2 Konzentration der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung 105

6.6.1.3 Spezifische Aktivität der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung 106

6.6.2 Inkubation von Mikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH 106

6.6.3 Analyse der Metaboliten 107

6.6.4 Korrelationen 108

6.6.5 Inhibitorstudien 108

6.6.6 Flüssigscintillationszählung 109

6.7 *umu*-Test 109

6.7.1 Bakterienstämme 109

6.7.2 Kultivierung der Bakterien 109

6.7.3 Konservierung der Bakterien 110

6.7.4 Durchführung des *umu*-Test 110

6.7.4.1 Herstellung der Bakteriensuspension 110

6.7.4.2 Metabolische Aktivierung 111

6.7.4.3 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität 112

6.7.4.4 Berechnung der Induktion der Genexpression 113

6.7.4.5 Inhibitorstudien 113

6.8 HPRT-Test 114

6.8.1 Zellkultur 114

6.8.1.2 Auftauen und Aussaat der Zellen 115

6.8.1.3 Passagieren der Zellen 115

6.8.1.4 Einfrieren der Zellen 116

6.8.1.4 Zellzählung 116

6.8.2 Bestimmung von HPRT-Vorwärtsmutationen in V79 h3A4 OR-Zellen 116

6.8.2.1 Inkubation der Testsubstanz 116

6.8.2.2 Selektion der HPRT-Mutanten 117

6.8.2.3 Auswertung 118

7 Literatur 120

1 Einleitung

1.1 Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Die Entstehung von Krebs (Kanzerogenese) ist ein mehrstufiger Prozeß, der sich in Initiations-, Promotions- und Progressionsphase unterteilen läßt. Neben erblichen Faktoren werden hauptsächlich äußere Einflüsse, sogenannte Krebsrisikofaktoren für die Tumorinitiation verantwortlich gemacht, die letztlich einen genetischen Schaden (Mutation) in der betroffenen Zelle bewirken. Zu den Krebsrisikofaktoren zählen neben Strahlung und Viren insbesondere die Exposition mit kanzerogenen Fremdstoffen.

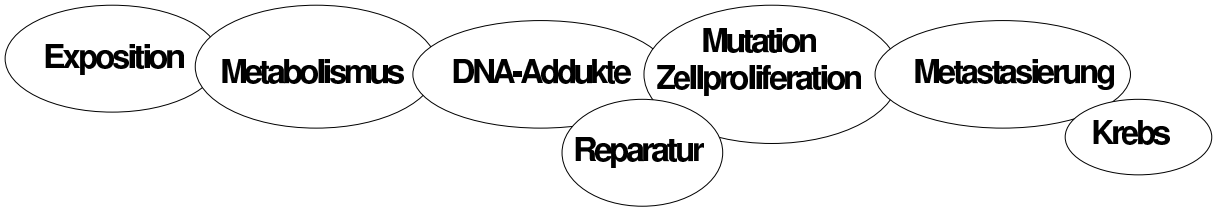


Abb.1.1 Schema zum Mehrstufenmodell der Kanzerogenese (nach Guengerich, 1996, modifiziert)

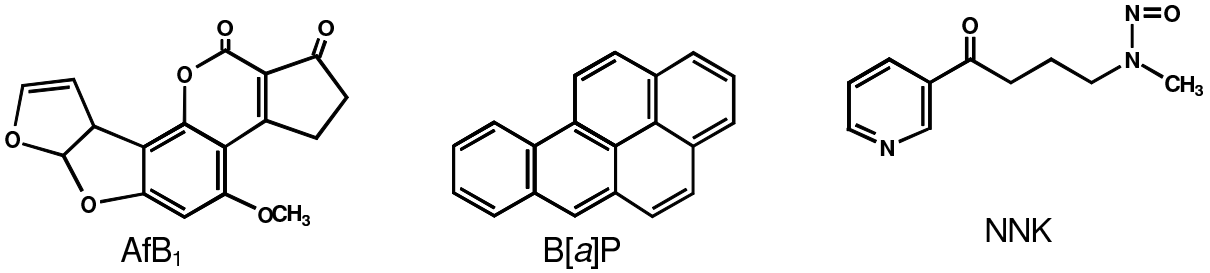
Kanzerogene Fremdstoffe können direkt wirken oder werden erst nach metabolischer Aktivierung biologisch aktiv. Sie können als Tumorinitiator, Promotor oder komplettes Kanzerogen wirken. Die Induktion von DNA-Schäden durch physikalische oder chemische Eigenschaften von Xenobiotika bezeichnet man als Genotoxizität. Wird ein in Folge genotoxischer Wirkungen entstandener DNA-Schäden nicht repariert sondern manifestiert, so entsteht eine Mutation (Lutz, 1990; Ashby, 1995).
Eine Mutation ist das Initiationsereignis hin zur Malignisierung einer Zelle, wobei mehrere Initiationsereignisse zusammenwirken können. Als Folge einer Aktivierung von Protoonkogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erhält die Zelle dadurch einen Wachstumsvorteil.
In der Promotionsphase wird das Zellwachstum der veränderten Zellen stimuliert, z.B. durch Eingriffe in die Signaltransduktion. Die verantwortlichen Promotoren be-

wirken selbst keine irreversible Veränderung der Zelle. Die entstehenden Zellpopulationen weichen in der Folge zunehmend vom Phänotyp der Ausgangszellen ab, wobei bis zur Tumorentstehung mehrere Jahre vergehen können. Ein Schema zur mehrstufigen Krebsentstehung ist in Abb. 1.1 wiedergegeben.

Nur wenige Krebsrisikofaktoren konnten bisher eindeutig für die Entstehung von spezifischen Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht werden. Ein Indiz, daß sogenannte „lifestyle"-Faktoren und weniger genetische Prädisposition für das individuelle Krebsrisiko bestimmend sind, ist zum Beispiel die Häufigkeit für das Auftreten bestimmter Tumoren bei Einwanderern, die sich bereits nach einer Generation der Auftrittshäufigkeit im Gastland anpasst. Durch eine Reihe epidemiologischer Studien ist der Zusammenhang zwischen Rauchen und der Entstehung von Lungenkrebs eindeutig belegt. Bei Teerarbeitern konnte die berufliche Expositionen mit der Entstehung bestimmter Tumoren in Verbindung gebracht werden (Harris, 1991; Eisenbrand & Metzler,1994, Guengerich, 1996 2)).

Zur Minimierung des Krebsrisikos für den Menschen und zur Entwicklung von Präventionsmaßnahmen ist daher die Identifizierung von chemischen Kanzerogenen und die Aufklärung ihres Wirkmechanismus von entscheidender Bedeutung.

Zu den sehr wirksamen chemischen Kanzerogenen zählen N-Nitrosoverbindungen wie 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon (NNK), Naturstoffe wie Aflatoxin B_1 (AfB_1) und auch zahlreiche polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) wie Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) (Abb.1.2).



AfB_1 B[*a*]P NNK

Abb. 1.2 Beispiele bekannter kanzerogener Stoffe

1.2 Fremdstoffmetabolismus

In der Entgiftung von Fremdstoffen unterscheidet man sogenannte Phase I- und Phase II-Reaktionen. Phase I-Reaktionen bewirken vor allem oxidative Veränderungen am Molekül, wobei funktionelle Gruppen wie Hydroxylgruppen in das Molekül eingeführt werden. Hierdurch wird ihre Polarität erhöht und damit die Ausscheidbarkeit verbessert. In Phase II wird diesem Metaboliten ein polares Molekül des Intermediärstoffwechsels angehängt (Glutathion, Glucuronsäure, Sulfat) und seine Polarität dadurch drastisch erhöht. Eine Reihe von Fremdstoffen stellen Prokanzerogene dar, die erst durch Phase I-Reaktionen in die aktive Form, die ultimalen Kanzerogene biotransformiert werden. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe sind eine Gruppe von Fremdstoffen, die ihre kanzerogene Wirkung erst nach endogener Aktivierung entfalten (Eisenbrand & Metzler, 1994).

1.3 Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen

Das Cytochrom P450 (CYP 450)-Monooxygenase-System ist eine Enzym-Superfamilie und das wichtigste Phase I-Enzymsystem des Fremdstoffmetabolismus. In der Ratte wurden bisher mehr als 50 Isoformen identifiziert, während beim Menschen 30 Isoformen bekannt sind (Waterman & Johnson, 1991; Marquardt & Schäfer, 1994).

1.3.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur der CYP 450-Isoenzyme basiert auf Homologien in der Aminosäuresequenz. Die erste Zahl bezeichnet die Familie der CYP-Isoenzyme. Zwei Isoenzyme gehören der gleichen Familie an, wenn ihre Sequenzhomologie 40-55% beträgt. Die Sequenzhomologie zweier Isoenzyme einer Unterfamile ist größer als 55% (Bezeichnung mit Buchstaben). Das einzelne Isoenzym wird wiederum mit einer Zahl gekennzeichnet. Zwei Isoenzyme gelten als identisch, wenn ihre Aminosäuresequenzen zu mehr als 97% identisch sind (Abb. 1.3) (Marquardt & Schäfer, 1997).

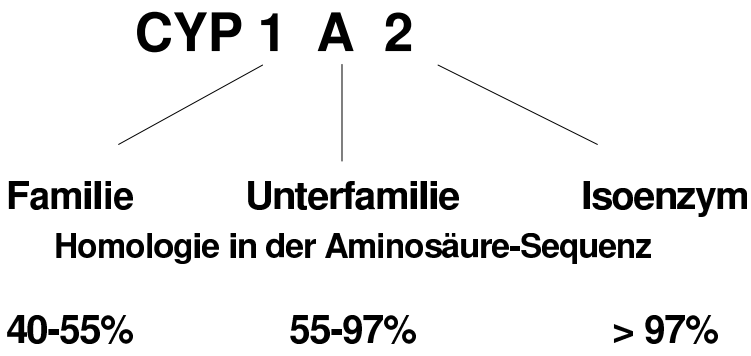


Abb.1.3 Nomenklatur der CYP 450-Isoenzyme

1.3.2 Funktion, Lokalisation und Reaktionszyklus

CYP 450-Enzyme katalysieren insbesondere Oxidationsreaktionen mit molekularem Sauerstoff unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. Ein Sauerstoffatom wird dabei in das Substrat eingebaut, das andere zu Wasser reduziert, folglich kann folgende Bruttogleichung formuliert werden:

$$\text{Substrat} + O_2 + \text{NADPH} \longrightarrow \text{oxigeniertes Substrat} + H_2O + NADP^+$$

CYP 450-Enzyme sind im wesentlichen lokalisiert in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, wo sie mit NADPH-Reduktase als Enzymkomplex vorliegen (Abb.1.4).

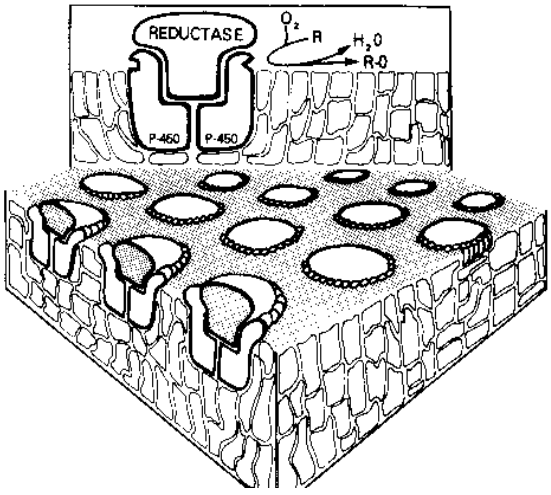


Abb.1.4 Lokalisation des CYP 450-Enzymkomplexes im endoplasmatischen Retikulum (Nebert, 1987)

CYP 450 ist ein Hämprotein mit einem Protoporphyrin IX als prosthetischer Gruppe mit einem komplex gebundenen Eisen-Ion (Eisenbrand, Metzler 1994) (Abb.1.5).

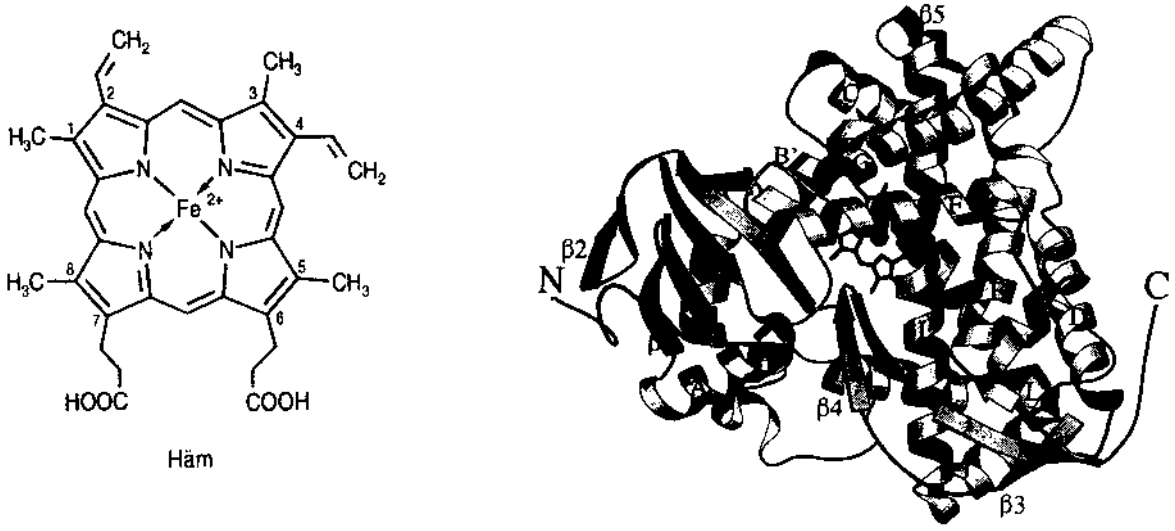


Abb.1.5 Häm-Struktur in CYP 450-Enzymen (Eisenbrand & Metzler, 1994) und dreidimensionale Proteinstruktur des bakteriellen CYP 102 mit Häm im Zentrum (Marnett & Kennedy, 1995)

Beim Reaktionszyklus der CYP 450-vermittelten Oxidation (Abb.1.6) wird zunächst ein lipophiles Substrat (RH) am aktiven Zentrum des Enzyms angelagert (1), anschließend wird der Enzym-Substrat-Komplex durch ein Elektron der CYP 450-Reduktase reduziert (2). Molekularer Sauerstoff wird mit hoher Affinität an das Fe^{2+} gebunden (3). Der entstandene Komplex übernimmt anschließend erneut ein Elektron von der Reduktase (4), das wie das erste Elektron von NADPH übertragen wird, wodurch der Sauerstoff formal in der Oxidationsstufe des Peroxids vorliegt. Nach Disproportionierung und Aufnahme zweier Protonen wird Wasser abgespalten (5). Im nächsten Schritt wird das Substrat mit dem verbleibenden Sauerstoff oxigeniert (6) und (7) (Anlagerung an eine Doppelbindung oder Einschub in eine C-H-Bindung). Im letzten Schritt löst sich das oxigenierte Substrat ab (8) (Eisenbrand & Metzler, 1994).

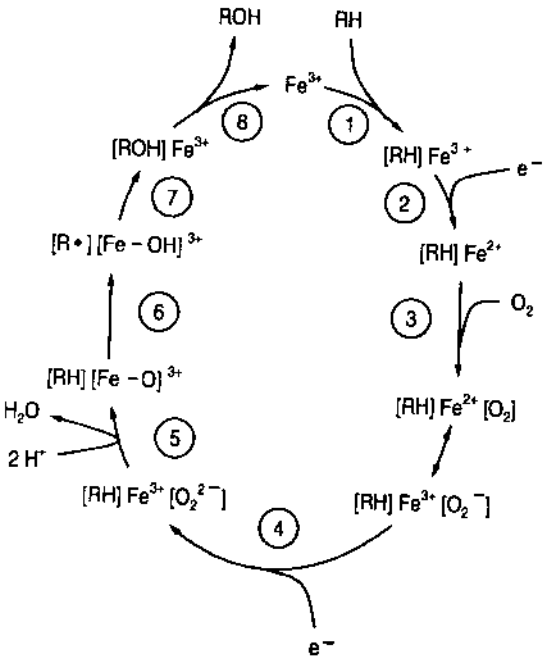


Abb1.6 Reaktionszyklus CYP 450-vermittelter Oxidationen

1.3.3 CYP 450-Isoformen

Eine einzige Isoform kann eine ganze Reihe von Substraten metabolisieren, während viele Substrate nur durch einzelne Isoenzyme metabolisiert werden. Weiterhin sind CYP 450 Enzyme an der Synthese von spezifischen endogenen Substraten beteiligt wie Fettsäuren, Steroiden und Eicosanoiden (Guengerich, 1995 2), Rendic & Di Carlo, 1997).

Die aufgereinigten Isoformen unterscheiden sich in ihren elektrophoretischen und immunochemischen Eigenschaften, Primärsequenzen und in ihren spezifischen katalytischen Aktivitäten. Kleinste Unterschiede zwischen den verschiedenen CYP 450-Proteinen können bereits dramatischen Einfluß auf die Substratspezifität und Aktivität des Enzyms ausüben bis zum völligen Verlust einer spezifischen Aktivität (Guengerich, 1995 2)). Die Gesamtaktivität sowie spezifische Aktivitäten werden hauptsächlich durch Veränderungen im Gesamtgehalt einzelner CYP-Isoenzyme bewirkt. Einige CYP 450-Isoformen sind induzierbar. Zahlreiche CYP 450-Induktoren sind beschrieben, die teilweise einzelne, meistens jedoch eine ganze Reihe von Isoenzymen induzieren (Dannan et al., 1983; Guengerich et al., 1982). Genetischer

Polymorphismus ist ein weiterer Aspekt im Zusammenhang mit CYP 450-Regulation, der sowohl in Versuchstieren als auch beim Menschen für bestimmte spezifische Aktivitäten beschrieben wurde. Ein solcher Polymorphismus ist definiert als ein genetisch bedingter Unterschied in der CYP 450-Isoenzym-Expression, der mehr als 2% einer Population betrifft. Phänotypisch kann sich der Polymorphismus im Fehlen einer spezifischen CYP 450-Isoenzym-Expression oder fehlender Induzierbarkeit einer CYP 450-Isoform äußern (Guengerich, 1995 2)).

Gleiche Isoenzyme verschiedener Tierspezies bezeichnet man als orthologe Enzyme. Sie weisen größere Sequenzhomologien auf als zwei Isoenzyme der gleichen Unterfamilie innerhalb der gleichen Spezies. Die orthologen Enzyme besitzen große Ähnlichkeiten in der Substratspezifität (Marquardt & Schäfer, 1994). Zwischen einzelnen Spezies können große Unterschiede im organspezifischen CYP 450-Isoenzym-Spektrum bestehen. In Tabelle 1.1 sind verschiedene Isoenzyme der Humanleber und Rattenleber gegenübergestellt (Soucek & Gut, 1992; Nedelcheva & Gut, 1994).

Tab. 1.1 Vergleich von CYP 450 Isoenzymen in Humanleber und Rattenleber

Rattenleber	**Anteil am Gesamt-CYP 450 [%] (Nedelcheva & Gut, 1994 Cresteil, 1998)**	**Humanleber**	**Anteil am Gesamt-CYP 450 [%]**	**Sequenzhomologie [%] (Soucek & Gut, 1992)**
1A2	2	1A2	13-18	80
2C11	54	2C	20-25	-
3A1	17	3A4	30-40	73

1.4 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

1.4.1 Definition und strukturelle Eigenschaften

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) ist die Sammelbezeichnung für aromatische Verbindungen mit kondensierten Ringsystemen. Sie sind hochlipophile, in Wasser praktisch unlösliche Stoffe mit hohen Schmelzpunkten und niedrigem Dampfdruck. Beispiele für PAK sind in Abb.1.7 wiedergegeben.
Lange Zeit galten PAK als der Prototyp planarer Moleküle. Kleine PAK wie Naphthalin sind planar. Während die Ausbildung einer sogenannten Bay-Region, wie sie z.B. beim B[*a*]P vorkommt, zu keiner Abweichung von der Planarität führt, ergaben Berechnungen der Molekülgeometrie und Röntgenstrukturanalysen, daß Moleküle, die eine stark sterisch gehinderte sogenannte Fjord-Region ausbilden nicht planar, sondern gewinkelt gebaut sind (Römpp, 1995; Zander, 1995).

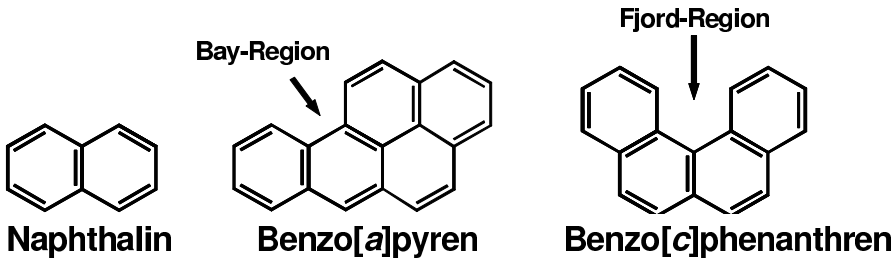


Abb.: 1.7 Beispiele für PAK

1.4.2 Nomenklatur

Das Grundprinzip der IUPAC-Nomenklatur für PAK besteht darin, daß die Namen größerer PAH aus den Trivialnamen kleinerer PAH (Basiskomponenten) gebildet werden. Zu den Basiskomponenten zählen u.a. Pyren und Phenanthren. Zur Bezeichnung der äußeren C-Atome und der C-C-Bindungen werden die Basiskomponenten so angeordnet, daß sich eine maximal mögliche Anzahl an Ringen auf einer horizontalen Linie befindet und gleichzeitig eine maximale Anzahl an Ringen rechts

oberhalb der Linie liegt. Die Bezifferung der C-Atome beginnt im obersten rechts gelegenen Ring mit Zahlen, die der C-C-Bindungen mit kleinen Buchstaben im Uhrzeigersinn von der 1,2-Bindung ausgehend (Abb.1.8) (Zander, 1995).

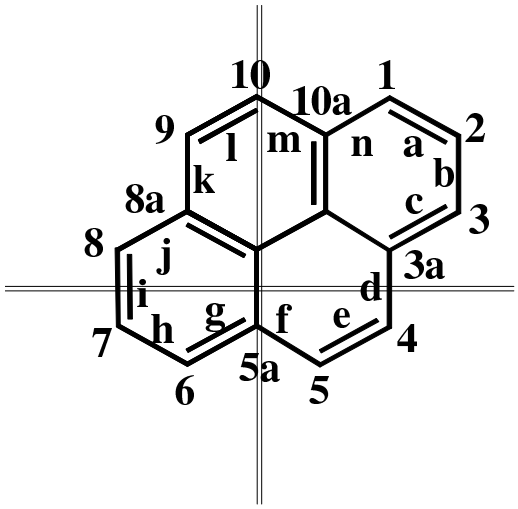


Abb.1.8 Nomenklatur polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe am Beispiel von Pyren

PAK, die nur aus Sechsringen aufgebaut sind bezeichnet man als „alternierend", solche, die zusätzlich Fünfringe in ihrer Struktur aufweisen als „nonalternierend".

1.4.3 Entstehung

PAK kommen als Verunreinigungen vorwiegend anthropogenen Ursprungs ubiquitär in der Umwelt vor. Sie werden durch Pyrolysereaktionen bei unvollständigen Verbrennungen (oberhalb 700°C) gebildet. Als Bildungsmechanismus nimmt man an, daß durch Spaltung von C-C-Bindungen kleine Kohlenstoffradikale entstehen, die sich über mehrere Zwischenstufen zu PAK vereinigen (Zander 1995). Stets wird ein sehr komplexes Gemisch verschiedener PAK gebildet, welches zusätzlich Nitro-PAK und heterocyclische PAK enthalten kann (Römpp 1995; IARC, 1983). Je nach Herkunft kann die gebildete PAK-Gesamtmenge um mehrere Größenordnungen variieren, ebenso das Spektrum der gebildeten Einzelverbindungen, insbesondere in Abhängigkeit von der Verbrennungstemperatur. Nachgewiesen wurden PAK v.a. im Abgas von Kohle-, Öl- und Gasfeuerungen, Autoabgasen aus Diesel- und Benzinmotoren und im Zigarettenrauch (Haupt- und Nebenstrom). 59 PAKs wurden in

Kraftfahrzeugabgasen, 120 in der Stadtluft eindeutig identifiziert (Snook et al., 1977; Zander, 1995).
An Partikel (Staub, Ruß) gebundene PAK werden in der Atmosphäre über weite Distanzen transportiert (Zander, 1995).

1.4.4 Industrielle Bedeutung von PAK

1819 entdeckte A.Garden Naphthalin im Steinkohlenteer, der als Nebenprodukt bei der Leuchtgasherstellung anfiel. Mehr als 90% des im Teer vorkommenden Kohlenstoffs liegt in aromatischen Verbindungen vor. In der Folgezeit gewannen aus Teeren isolierte PAK wie z.B. Naphthalin und Anthracen an Bedeutung in der Farbenindustrie. Große Bedeutung besitzen PAK in der Metallurgie. Die Aluminiumherstellung erfolgt durch Schmelzflußelektrolyse von Aluminiumoxid und Kryolith. Die dabei verwendeten Elektroden bestehen aus Kokspulver, das mit einem komplexen Gemisch verschiedener PAK gebunden ist. Aus PAK-Gemischen werden auch technische Ruße erzeugt, die bei der Herstellung von Autoreifen benötigt werden (Zander, 1995).

1.4.5 PAK in Lebensmitteln

PAK sind als Spurenkontaminanten auch in Nahrungsmitteln vorhanden. Zum einen werden Lebensmittel über die Luft mit PAK kontaminiert. Infolgedessen zählt Blattgemüse, welches über seine große Oberfläche PAK-haltige Staubpartikel bindet zu den besonders belasteten Lebensmitteln. Es wird geschätzt, daß der Hauptanteil der PAK-Aufnahme beim Menschen über Lebensmittel durch Obst und Gemüse erfolgt. Zu den Verarbeitungsprozessen, bei denen PAK in Lebensmittel eingebracht oder gebildet werden, gehören das Räuchern, vor allem in seiner traditionellen Form, Darren von Getreide, Rösten von Kaffee und die Rauchgastrocknung von Ölsaaten, wobei die Lipophilie des Lebensmittels (Fette, Öle) die Anreicherung von PAK begünstigt. Besonders hohe PAK-Gehalte wurden bei gegrillten Lebensmitteln gemessen (Ernährungsbericht 1996; Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.). Nach

Wallenhorst und Schwenk (1998) ergeben sich orale Aufnahmemengen von 2-500 ng/Tag durch die Nahrung und 4 ng/Tag durch das Trinkwasser

In Deutschland gelten eine Reihe rechtlicher Regelungen zur Belastung von Lebensmitteln mit PAK. Für geräucherte Fleischwaren und Käse sowie Käsezubereitungen gilt ein Grenzwert für B[*a*]P von 1ppb; die Summe ausgewählter PAK im Trinkwasser ist auf 0,2 ppb limitiert. Eine EU-Richtlinie empfiehlt für traditionell geräucherte Fleischwaren eine B[*a*]P-Belastung nicht über 1 µg/kg, für geräucherten Fisch nicht über 5 µg/kg. Für Zubereitungen aus Räucherrauchkondensaten zur Aromatisierung von Lebensmitteln, sogenannten „Flüssigrauchzubereitungen", wurde eine Richtkonzentration für B[*a*]P von 10 µg/kg Zubereitung (max. 0,03 µg/kg im aromatisierten Lebensmittel) vorgeschlagen (Council of Europe Publishing,1992 1), 2)).

In Tabelle 1.2 sind Gehalte für Benzo[*a*]pyren in Lebensmitteln aufgelistet:

Tab. 1.2 Gehalte von B[*a*]P in Lebensmitteln

Lebensmittel	**B[*a*]P [µg/kg]**	**Referenz**
Fleisch (gegrillt)	**0,1-1,5**	**Lodovici et al., 1995**
Geflügel (geräuchert)	**0,1-0,8**	**Gomaa et al., 1993**
Schweine- und Rindfleisch (geräuchert)	**0,2-2,5**	**Gomaa et al., 1993**
Fisch (geräuchert) **-mit externem Rauchgenerator** **-traditionelle Räuchertechnik**	 **0,01-0,03** **0,9**	**Karl & Leinemann, 1996**
Flüssigrauch	**max 3,4**	**Gomaa et al., 1993**
Speiseöl	**0,6 (Mittelwert)**	**Lodovici et al., 1995**
Traubenkernöl	**max 43**	**Lodovici et al., 1995**
Nüsse	**max 0,2**	**De Vos et al., 1990**
Röstkaffee	**max 1,2**	**Maier et al., 1991**

1.4.6 Kanzerogenität von PAK

Bereits 1775 berichtete Percival Pott über eine hohe Inzidenz des Scrotumkrebses bei Londoner Schornsteinfegern und stellte dies in ursächlichen Zusammenhang mit der Exposition gegenüber Ruß und Asche. 1892 wurde das Auftreten von Hautkrebs und Krebs der inneren Organe bei Schornsteinfegern und Teerarbeitern bekannt. PAK wurden schließlich als krebsauslösendes Agens im Teer identifiziert. Zahlreiche PAK sind kanzerogen im Tierversuch, mit unterschiedlichem Potential. Sie erzeugen nach systemischer Aufnahme Krebs vor allem in Lunge und Leber, können jedoch auch lokal Tumore erzeugen wie man es z.B. bei der Behandlung von Mäusehaut beobachtet hat. Im Mehrstufenmodell der Kanzerogenese besitzen sie vor allem Bedeutung als Initiatoren.
Epidemiologische Studien belegen ein erhöhtes Krebsrisiko für Hochofenarbeiter und Arbeiter in der Aluminiumproduktion, welches mit der erhöhten PAK-Exposition in diesen Bereichen korreliert (IARC, 1983, 1984; Harris, 1991). Es konnte weiterhin in einer Studie in China gezeigt werden, daß eine hohe Lungenkrebssterblichkeit mit der Rauchgasexposition aus Kohleheizungen und erhöhten PAK-DNA-Addukgehalte bei den betroffenen Personen korreliert (Mumford et al., 1993). Für Tabakrauch-induzierten Krebs werden auch PAK verantwortlich gemacht (IARC, 1983; Shimada & Guengerich, 1991).

1.4.7 Exposition des Menschen mit PAK

Die PAK-Exposition beim Menschen erfolgt im wesentlichen über die Atmungsorgane, den Verdauungstrakt und die Haut. Die Aufnahme über die Atmungsorgane erfolgt durch PAK-haltige Aerosole und Tabakrauch. Über den Verdauungstrakt werden PAK durch den Verzehr von belasteten Lebensmitteln aufgenommen. Hautkontakt mit PAK erfolgt haupsächlich berufsbedingt durch Umgang mit PAK-haltigen Materialien z.B. in Kokereien, bei Asphaltarbeitern, der Aluminium- und Graphitelektrodenproduktion (Angerer et al., 1997 1)). Die Belastung durch Tabakrauch und berufsbedingte Exposition leistet den Hauptbeitrag für betroffene Personengruppen, während umweltbedingte Faktoren von geringerer Bedeutung sind (Angerer et al., 1997 2), Gündel et al., 1996; Göen et al., 1995). Als Maßnahme zur Expositionsbe-

grenzung hat die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft für B[*a*]P eine technische Richtkonzentration am Arbeitsplatz von 0,002 mg/m^3 Luft (0,005 mg/m^3 Luft in Strangpechbetrieben und Kokereien) festgelegt.

1.4.8 Kinetisches Verhalten von PAK im Organismus

Aufgrund ihrer Lipophilie können PAK die Lipoproteinmembranen von Säugerzellen sehr leicht passieren. Nach 6h wurden 20-56% einer dermalen PAH-Dosis absorbiert. Hierbei wurden geringe interindividuelle Unterschiede, jedoch große Unterschiede zwischen verschiedenen Applikationsorten festgestellt (Van Rooij et al., 1993).
Inhalativ aufgenommene, an Partikel gebundene PAK werden im Lungengewebe resorbiert oder weiter über das Sputum in den Gastrointestinaltrakt transportiert, wo sie ebenso wie oral über die Nahrung aufgenommenen PAK im Darm resorbiert, über die Pfortader der Leber zugeführt und dort metabolisiert werden. Nach direkter Injektion von PAK ins Blut werden diese verteilt und können danach in den meisten inneren Organen nachgewiesen werden. Die PAK-Gehalte im Blut nehmen rasch ab, die biliäre Sezernierung der Metabolite dagegen zu. Es kommt schließlich zur Anreicherung v.a. im Fettgewebe, den mesenterialen Lymphknoten und den Ovarien. PAK können über die Plazenta auf den Fetus übergehen (IARC, 1983).
Die Ausscheidung der fast vollständig in der Leber metabolisierten PAK erfolgt nach ihrer hepatobiliären Sezernierung hauptsächlich über die Fäces (Hecht et al, 1979). In der Ratte wurden signifikante interindividuelle Unterschiede bei der Ausscheidung von B[*a*]P-Metaboliten festgestellt (Likhachev et al., 1992).

1.4.9 Metabolismus von PAK

PAK in Ihrer Ausgangsform sind Präkanzerogene, die erst durch Metabolisierung in ihre biologisch aktive Form überführt werden. Die Metabolisierung erfolgt mehrstufig: Cytochrom P450-vermittelte Oxidation (Phase I) führt zu Epoxiden. Durch anschließende Hydrolyse können Phenole, Dihydrodiole und Chinone gebildet werden. Die Bildung der Dihydrodiole aus dem primären Epoxid wird durch Epoxidhydrolasen

katalysiert. Weiterhin wird durch die Funktionalisierung der Ausgangsverbindung die Bildung von Konjugaten mit Glucuronsäuren, Glutathion und die Sulfatierung (Phase II) ermöglicht.

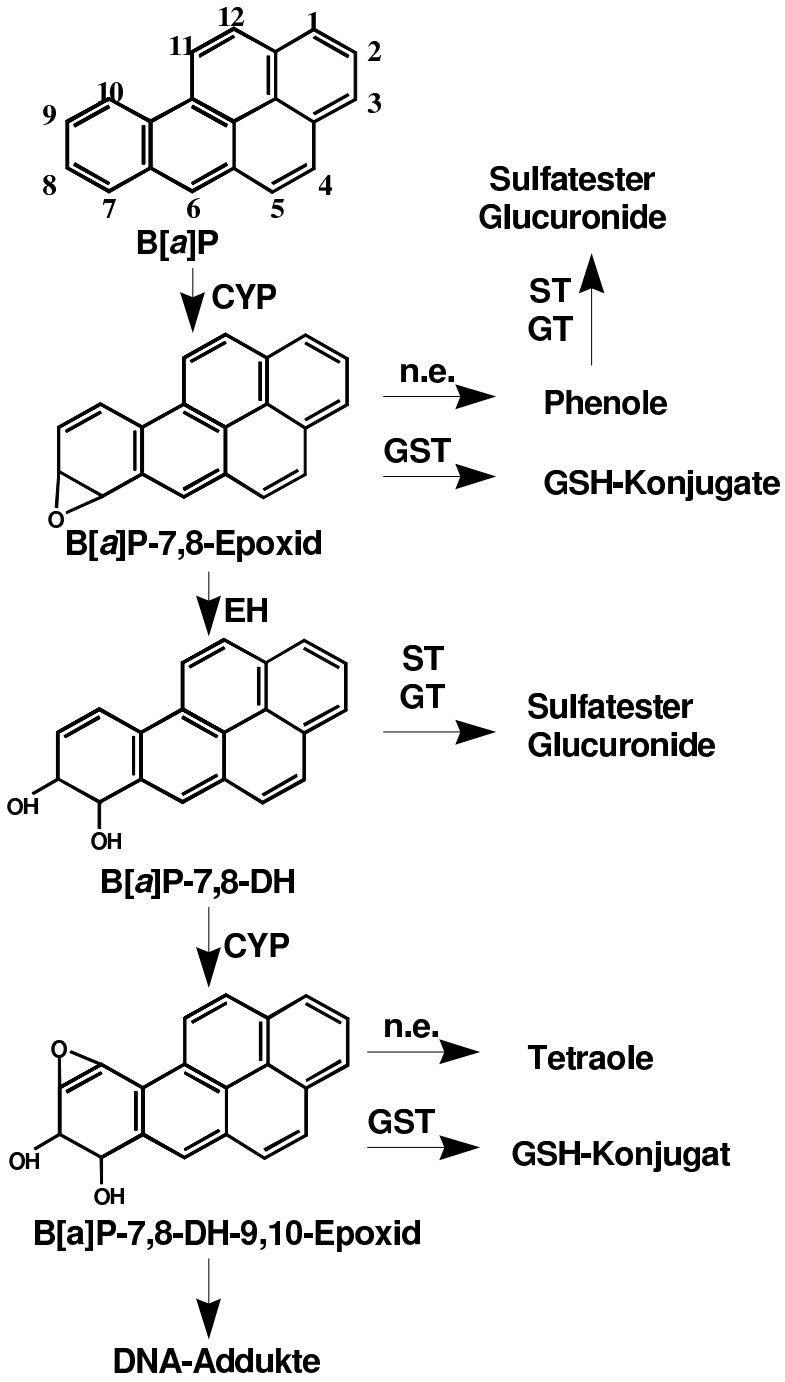


Abb. 1.8 Schema zum Metabolismus von B[*a*]P zum ultimalen Kanzerogen und mögliche Entgiftungswege (Luch & Platt, 1996); CYP: Cytochrom P450; EH: Epoxidhydrolase, n.e.: nicht-enzymatisch; GST: Glutathion-S-Transferase; ST: Sulfotransferase; GT: Glucuronyltransferase; GSH: Glutathion)

Die Bildung der Dihydrodiole ist der kritische Schritt der Biotransformation: Weiteroxidation eines Dihydrodiols führt zum ultimal kanzerogenen Dihydrodiolepoxid. Letzteres reagiert unter Bildung kovalenter Addukte mit der DNA oder wird durch Phase II-Konjugationsreaktionen oder Hydratisierung zum Tetraol entgiftet.

Der Metabolismus des kanzerogenen **Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P)** ist eingehend untersucht. Ungefähr 20 B[*a*]P-Metabolite und eine Vielfalt von Konjugaten wurde identifiziert. Eine ganze Reihe dieser Verbindungen induziert Mutationen und bindet an intrazelluläre Makromoleküle. Als ultimales Kanzerogen wird jedoch nur das B[*a*]P-7,8-DH-9,10-Epoxid angesehen

Die Epoxidierung von B[*a*]P erfolgt zunächst in 4,5-, 7,8-, oder 9,10-Position. Die reaktiven Epoxide hydratisieren unter Beteiligung einer Epoxidhydrolase zu Dihydrodiolen oder bilden nichtenzymatisch Phenole über eine Carbonyl-Zwischenstufe (NIH-Shift). Phenole können metabolisch zu Chinonen weiteroxidiert werden. Die Metabolite werden sulfatiert, mit Glucuronsäure oder Glutathion konjugiert und somit entgiftet. B[*a*]P-Dihydrodiole werden unter Beteiligung von CYP 450-Enzymen weiter zu DH-Epoxiden oxidiert.

Die Epoxidbildung dominiert jedoch lediglich beim 7,8-DH, wobei B[*a*]P-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxid als ultimales Kanzerogen gebildet wird. Dieses kann als Elektrophil mit den nucleophilen Bestandteilen der DNA reagieren. Die Entgiftung erfolgt durch Hydrolyse zum Tetraol oder durch Glutathion-S-transferase-vermittelte Konjugation mit GSH (Abb. 1.8).

Die Bildung der B[*a*]P-DH-Epoxide erfolgt stereospezifisch (Abb. 1.9).

Zwei Diastereomere von B[*a*]P-7,8-DH-Epoxiden sind formulierbar, die in je zwei enatiomeren Formen vorkommen (Abb.6). Bei der Inkubation von CYP 450-haltigen Rattenlebermikrosomen mit B[*a*]P wird hauptsächlich (+)-B[*a*]P-7,8-Epoxid gebildet, welches stereospezifisch unter Beteilgung einer Epoxidhydrolase das (-)-B[*a*]P-7,8-DH ausbildet. Über einen weiteren Oxidationsschritt wird das (+)-*anti*-B[*a*]P-7,8-DH-9,10-Epoxid bevorzugt gebildet.

Humane Lungenmikrosomen generieren ebenfalls bevorzugt (+)-*anti*-B[*a*]P-7,8-DH-9,10-Epoxid (Rojas et al., 1992). Humane Lebermikrosomen bilden aus B[*a*]P das 7,8-DH als einen der Hauptmetaboliten neben 3-OH, 1-OH B[*a*]P und B[*a*]P-9,10-DH (Staretz et al., 1996).

Außer durch Cytochrom P450 kann die Aktivierung von B[*a*]P-Dihydrodiolen zum Dihydrodiolepoxid auch durch Peroxylradikale erfolgen, die *in vivo* bei der enzymatischen Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren gebildet werden. Zusätzlich können Dihydrodiole kooxidativ beim Arachidonsäuremetabolismus durch Prostaglandin H-Synthetase oder in Leukozyten durch Myeloperoxidase epoxidiert werden.

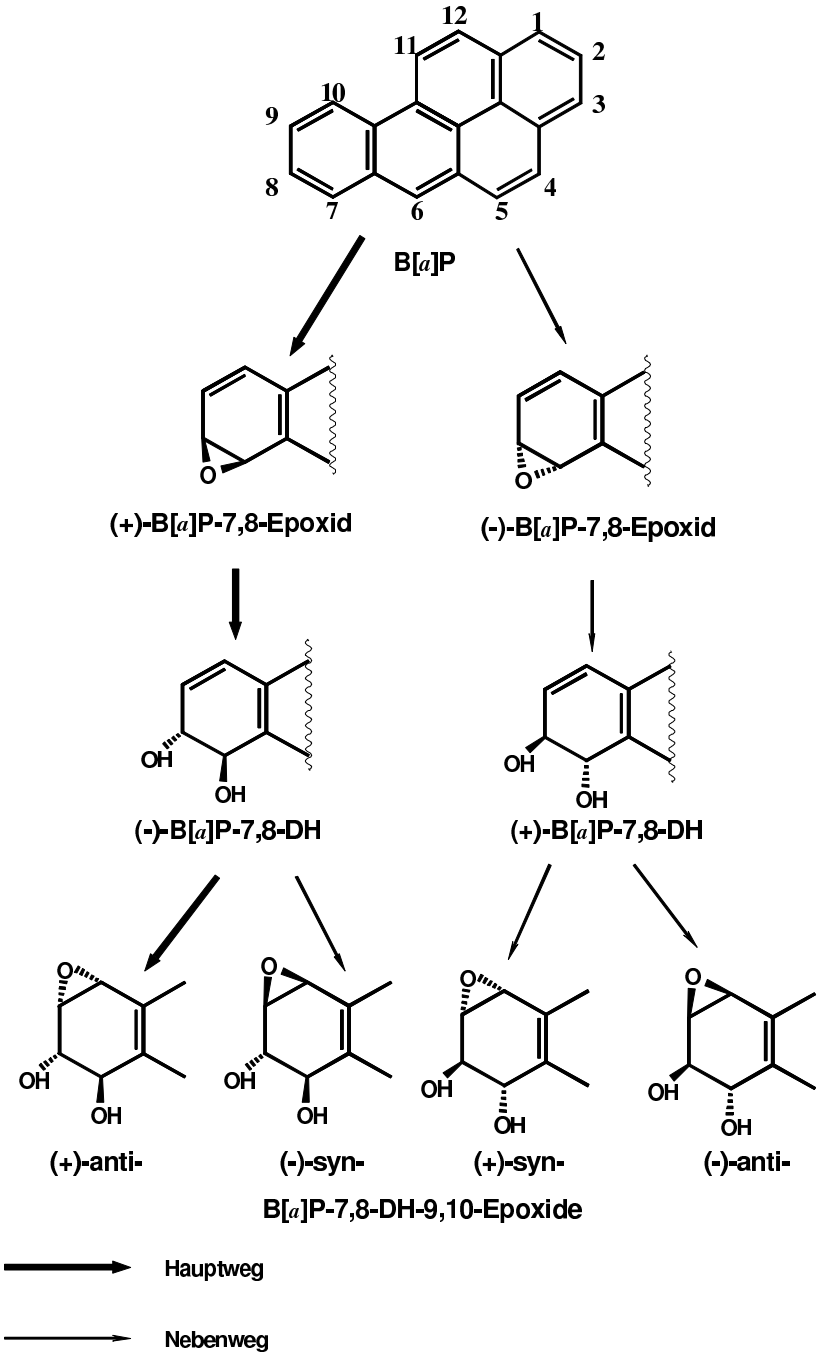


Abb. 1.9 Stereospezifische Aktivierung von B[*a*]P (nach IARC,1983; Rojas et al., 1992; Jones et al, 1995)

1.4.10 Struktur-Wirkungsbeziehungen von PAK

Mehrere Faktoren werden inzwischen für das unterschiedliche kanzerogene Potential der einzelnen PAK verantwortlich gemacht. Die **Bay-Region oder Fjord-Region** (erweiterte Bay-Region) als Strukturmerkmal gilt als Hinweis auf eine hohe biologische Aktivität der Verbindung (Levin et al., 1982). Eine Bay-Region oder Fjord-Region liegt dann vor wenn das kondensierte Ringsystem eine Bucht und damit eine sterisch gehinderte Region ausbildet. Dihydrodiolepoxide, die unmittelbar an der Bay-Region ausgebildet werden sind häufig besonders reaktiv und somit biologisch aktiv sind. Beispiele sind das 7,8-DH-9,10-Epoxid von B[*a*]P und das 3,4-DH-1,2-Epoxid von B[*c*]PH (vgl. 2.1)
Die Bay-Region-Theorie wiederum besagt aufgrund von Molekülorbitalberechnungen, daß eine Korrelation zwischen der chemischen Reaktivität am benzylischen C-Atom des Epoxidringsystems und biologischer Wirksamkeit der Verbindungen besteht (Luch & Platt, 1996).
Die biologische Aktivität eines PAK wird weiterhin durch seine Substrateigenschaften für das aktivierende Enzymsystem wesentlich mitbestimmt. Nur einzelne Metabolite stellen Kanzerogene dar, wie das 7,8-DH-9,10-Epoxid im Falle von B[*a*]P. Daher ist das gebildete Metabolitenspektrum neben der biologischen Aktivität der einzelnen Metabolite von entscheidender Bedeutung.

1.4.11 Übertragung von Kanzerogenitätsstudien am Tier auf den Menschen

Stoffe werden nur dann als Kanzerogene bezeichnet wenn sie im Tierversuch nichtspontane Tumore erzeugen, die Tumorinzidenz erhöhen, die Latenzzeit bis zur Tumorbildung verkürzen oder die Anzahl der Tumore pro Tier erhöhen.
Daten zur Kanzerogenität eines Stoffes, die in Tierversuchen ermittelt wurden, müssen durch Modellsysteme auf die Situation beim Menschen übertragen werden. Bei PAK, die erst nach metabolischer Aktivierung in das ultimale Kanzerogen biotransformiert werden, ermöglichen *in vitro*-Untersuchungen mit den aktivierenden CYP

450-Enzymen Aussagen zu einer möglichen speziesabhängigen Toxifizierung der Substanzen, die für die Übertragung von Daten aus Tierversuchsdaten wesentlich sind.

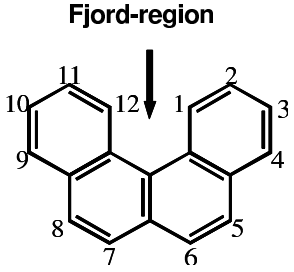
Die aktivierenden Enzyme können in verschiedenen Formen eingesetzt werden. Gewebepräparationen (Mikrosomen) enthalten das organspezifische Spektrum der CYP 450-Isoenzyme und zusätzlich beteiligter Enzyme wie Epoxidhydrolasen. Aus Gewebe aufgereinigte sowie in Mikroorganismen exprimierte rekombinante CYP 450-Isoenzyme erlauben Untersuchungen an einzelnen CYP 450-Isoformen.

Säugerzellen, die humane CYP 450-Enzyme exprimieren (z.B. transfizierte Lungenfibroblasten des syrischen Hamsters) oder Humanzellkulturen (z.B. humane MCF7-Mammacarcinomzellen) sind weiter Modellsysteme für den Menschen.

Die Gegenüberstellung CYP 450-vermittelter speziesspezifischer Metabolismuswege sowie vergleichende *in vitro*-Untersuchungen zur Mutagenität nach speziesspezifischer Aktivierung ermöglichen eine Risikobewertung für den Menschen (Guengerich, 1995 1),2)).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Benzo[*c*]phenanthren



Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]PH) ist die einfachste Verbindung mit einer stark sterisch gehinderten *Fjord-Region* als Strukturmerkmal. Die Verbindung ist unplanar. Der Winkel zwischen den beiden Naphthalineinheiten beträgt 29,6° (Zander 1995).

2.1.1 Vorkommen

B[*c*]PH wurde bisher im **Hauptstrom der Zigarette** (nicht quantifiziert) (Van Duuren, 1958; Snook et al., 1977), in **Abgasen aus Verbrennungsmotoren** (nicht quantifiziert) (Grimmer et al., 1977), **Oberflächenwasser** (1,0-9,1 ng/l) und **Abwasser** (0,042-0,699 µg/l) (Grimmer et al., 1981) nachgewiesen.
Sofern B[*c*]PH im Rahmen von PAK-Analysen in Lebensmitteln bestimmt wurde, liegen die Gehalte regelmäßig in der gleichen Größenordnung oder über denen von B[*a*]P:

Lebensmittel	**B[*c*]PH [µg/kg]**	**B[*a*]P [µg/kg]**	**Referenz**
Fleisch (geräuchert)	0,15-2,15	0,05-0,15	Fretheim et al., 1976
Früchte	max 0,5	nicht nachgewiesen	De Vos et al., 1990
Cerealien	max 2,9	0,8	De Vos et al., 1990
Nüsse	2,0 (Mittelwert) max 12	max 0,2	De Vos et al., 1990

2.1.2 Biologische Aktivität

B[*c*]PH gilt als nur schwach biologisch aktiv in Nager-Bioassays. Erste Studien hierzu wurden von Badger et al. (1940) durchgeführt und ergaben nur eine schwache Aktivität. Levin et al. (1980) konnte in einem Initiations-Promotions-Experiment die schwache kanzerogene Wirkung von B[*c*]PH belegen. Mäuse erhielten Einzeldosen von 0,4 bzw. 2µmol B[*c*]PH, gefolgt von wöchentlicher Behandlung mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) über 20 Wochen. Nur 17% bzw. 38% der Tiere generierten lokal Hauttumore. Nach intraperitonealer Injektion von 10, 50 oder 150 nmol B[*c*]PH in neugeborene Mäuse wurden lediglich in 36-37% der Tiere Lungentumore nachgewiesen, während Lebertumore nicht gefunden wurden (Levin et al., 1986).

Die von B[*c*]PH-3,4-DH abgeleiteten DH-Epoxide erwiesen sich hingegen in den gleichen Testsystemen als ausgesprochen aktiv. Insgesamt lassen sich vier unterschiedliche B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide formulieren, jeweils Enantiomerenpaare in denen die Epoxygruppe *syn*- oder *anti*- zur benzylischen OH-Gruppe steht (Abb. 2.1). Sowohl die *syn*- als auch die *anti*-DH-Epoxide erzeugen im Initiations-Promotionsexperiment auf Mäusehaut Tumore in 80-90% der behandelten Tiere. (Levin et al., 1980). Von den 4 möglichen Stereoisomeren erwies sich lediglich das (-)-*syn*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid als schwächer tumorinitiierend. Bestätigt wurde dieser Befund von Amin et al. (1993). Auf Mäusehaut appliziert erzeugte *anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid in Dosen von 100 und 400 nmol mit anschließender TPA-Behandlung Hauttumore in 95% bzw. 100% der Tiere.
Hecht et al. (1994) verglichen die Kanzerogenität von *anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide mit jenen von *anti*-B[*a*]P-7,8-DH-9,10-Epoxid nach direkter Injektion (je 2.04 µmol) in die Brustdrüse der Ratte. B[*c*]PH-DH-Epoxid erzeugte 34 Wochen nach der Injektion Mammatumore in 100%, B[*a*]P-7,8-DH-9,10-Epoxid hingegen nur in 50% der Tiere. Weitere Studien im selben Testsystem ergaben eine tumorinitiierende Wirkung von B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid, die mit jener des extrem starken Kanzerogens Dibenzo[*a,l*]pyren-11-12-DH-13,14-Epoxid vergleichbar war. Dibenzo[*a,l*]pyren (DB[*a,l*]P) ist das stärkste Kanzerogen unter den bisher getesteten PAK (Amin et al., 1995 1),2)) (vgl.2.2).

In vitro-Studien belegen zusätzlich die starke biologische Aktivität der B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide. In *S. typhimurium* TA 98 und TA 100 und V79-Säugerzellen erwiesen sich sowohl die *syn*- als auch die *anti*- Isomere als potente Mutagene (Wood et al., 1980, 1984).

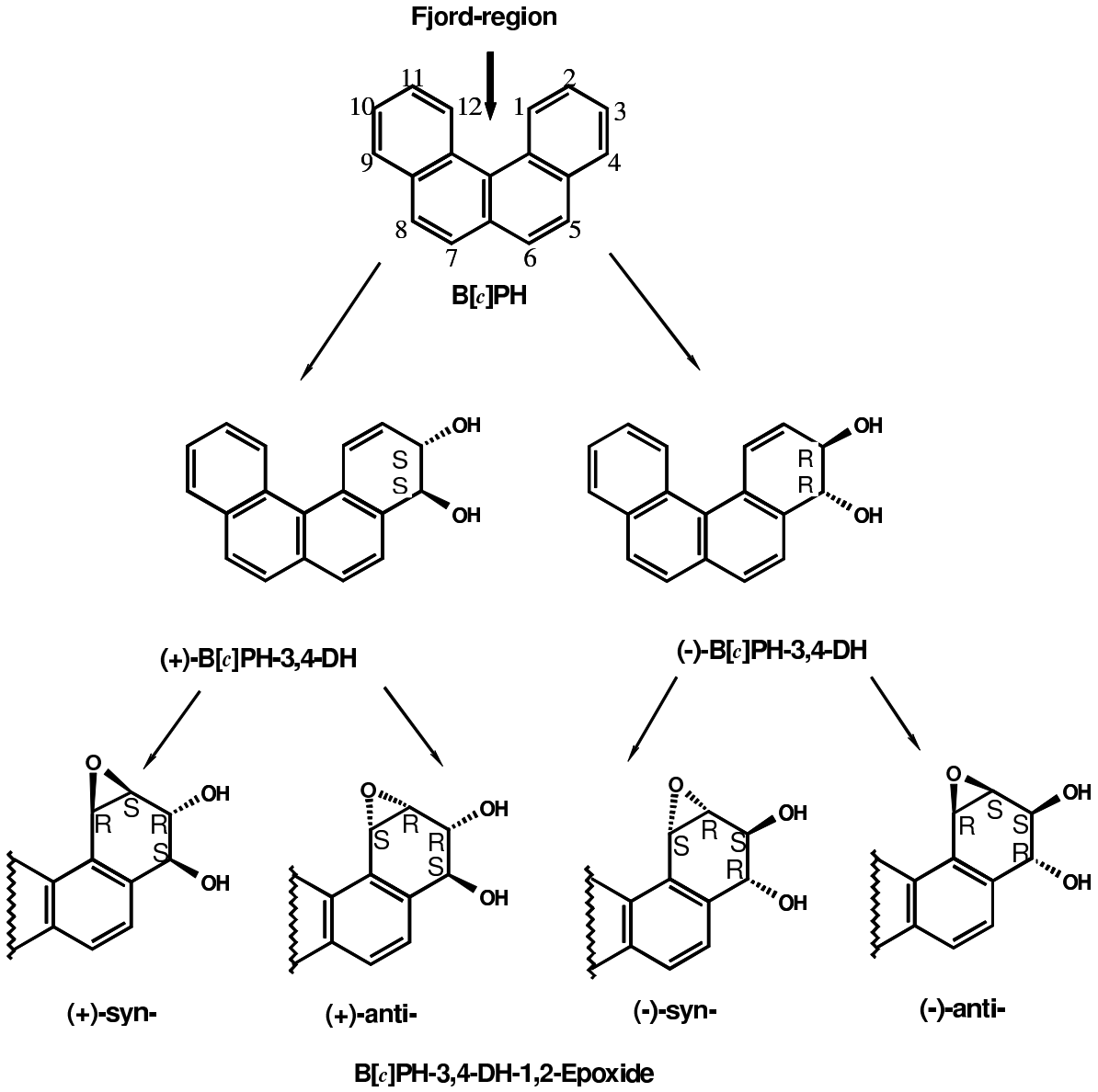


Abb.2.1 Stereoselektiver Metabolismus von B[c]PH zu Fjord-Region-Diolepoxiden (nach Seidel et al., 1998, modifiziert)

Von den vier möglichen Stereoisomeren erwies sich (-)-*anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid als am aktivsten (Wood et al., 1984).

Nur wenige Studien zur Beurteilung der biologischen Aktivität der möglichen B[*c*]PH-Dihydrodiole sind verfügbar. Das B[*c*]PH-3,4-DH als Vorläuferverbindung der Fjord-Region-Epoxide erwies sich nach Aktivierung mit Rattenlebermikrosomen als zweifach stärker mutagen in *S. typh.* TA 98 und TA 100 und erzeugte um Faktor 5 mehr HPRT-Mutationen in V79-Säugerzellen. B[*c*]PH-5,6-DH zeigte schwache, jedoch signifikante Aktivität in beiden Systemen, die Aktivität von B[*c*]PH-1,2-DH hingegen lag im Bereich der Kontrolle (Wood et al., 1980). *In vivo* erzeugte lediglich B[*c*]PH-3,4-DH Tumore im Initiations-Promotions-Experiment auf der Mäusehaut (Levin et al., 1980). B[*c*]PH-3,4-DH (50 nmol) erzeugte nach intraperitonealer Applikation in neugeborene Mäuse, Lungentumore in 37% der Tiere (Levin et al., 1986).

2.1.3 Metabolismus beim Tier

Metabolismusstudien ergaben, daß B[*c*]PH ein gutes Substrat für Mikrosomenpräparationen aus Rattenlebern darstellt. Sie generieren B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetaboliten, jedoch nur geringe Mengen an 3,4-DH als Vorläufer der kanzerogenen B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide (Ittah et al., 1983). Aufgereinigte CYP 450-Isoenzyme aus Rattenleber generieren in Gegenwart von Epoxidhydrolase fast ausschließlich B[*c*]PH-5,6-DH, das 3,4-DH wird zu weniger als 5% gebildet (Ittah et al., 1983). In der geringen Bildung des B[*c*]PH-3,4-DH wird der Grund für die geringe biologische Aktivität von B[*c*]PH gesehen. Die These wird gestützt durch *in vivo*-Metabolismusstudien im Nager. In Mäusehaut werden nach Auftragen von 2 µmol B[*c*]PH nur sehr geringe Mengen an DNA-Addukten gemessen, während nach Behandlung mit 0,4 µmol B[*c*]PH-3,4-DH 6-fach mehr Addukte nachgewiesen werden konnten. Die Adduktbildung erfolgte hauptsächlich durch Reaktion des (+)-*syn*- und (-)-*anti* B[c]PH-3,4-DH-1,2-Epoxids mit Desoxyadenosin.

Embryonalzellen von Maus, Ratte und syrischem Hamster generieren nach Behandlung mit B[*c*]PH hauptsächlich Addukte mit dem (-)-*anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid, sowie in geringerem Ausmaß mit (+)-*syn*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid (Desoxyadenosin- und Desoxyguanosin-Addukte im Verhältnis 3:1). Behandlung mit Enantiomerenmischungen von *syn*- und *anti*- B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid führen zur Bildung von DNA-Addukten sowohl mit dem (+)- als auch mit dem (-)-Enantiomer

(Pruess-Schwartz et al., 1987). Die spezifische Adduktbildung wird daher nicht auf unterschiedliche Reaktivität der Dihydrodiolepoxide als vielmehr auf stereoselektive Aktivierung zurückgeführt. Auch *in vitro* wurden die höchsten DNA-Adduktausbeuten mit Desoxyadenosin und dem (-)-*anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-Epoxid gefunden (Agarwal et al., 1996 1); 2)).

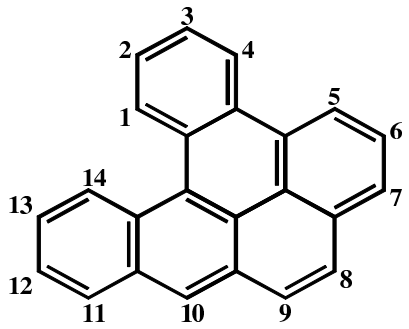
Lebermikrosomen nicht-induzierter und phenobarbitalinduzierter Ratten generieren beide B[*c*]PH-3,4-DH-Enantiomere aus B[*c*]PH, solche von Ratten, die mit Aroclor- und Methylcholanthren induziert wurden fast ausschließlich das R,R-Isomer. (Mushtaq & Yang, 1987).

2.1.4 Metabolismus beim Menschen

Bisher sind nur wenige Daten zum Metabolismus beim Menschen verfügbar. Einolf et al. (1996) konnten nachweisen, daß humane Mammacarcinomzellen (MCF-7) B[*c*]PH zu DNA-bindenden Dihydrodiolepoxiden aktivieren. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden vor allem *trans*-Addukte von Desoxyadenosin mit dem (-)-*anti*-B[c]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid nachgewiesen, während bei parallel durchgeführten Studien zur Aktivierung in Mäusehaut nur geringe Aktivierung festzustellen war. Wenngleich beide Systeme nicht direkt verglichen werden können, so lieferte die Studie Hinweise dafür, daß in humanen Zellen eine effiziente Aktivierung von B[*c*]PH möglich ist. Weiterhin wurden Hinweise auf die Beteiligung der CYP 450-Isoenzyme 1A1 und 1B1 an der Aktivierung erhalten; CYP 1B1 wurde durch B[*c*]PH-Exposition der Zellen zusätzlich induziert. CYP 1B1 schien effektiver zu aktivieren als CYP 1A1 (Einolf et al., 1997).

Seidel et al. (1998) untersuchten den B[*c*]PH-Metabolismus in V79-Zellen, die unterschiedliche humane CYP 450-Isoformen exprimieren. B[*c*]PH-3,4-DH wurde in CYP 1A1-, 1A2-, 1B1- und 2E1- exprimierenden Zellen nachgewiesen, wenngleich mit Ausnahme von CYP 1A2 immer B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetabolit gebildet wurde. Lediglich CYP 1B1 generierte Tetraole aus dem (-)-3R,4R-Enatiomer des B[*c*]PH-3,4-DH (Abb 2.1).

2.2 Dibenzo[*a,l*]pyren



2.2.1 Vorkommen

Nur wenige Daten zum Vorkommen von DB[*a,l*]P in der Umwelt sind bisher verfügbar. DB[*a,l*]P wurde nachgewiesen in **Verbrennungsprodukten**, **flüssigen fossilen Brennstoffen**, sowie im **Hauptstrom des Zigarettenrauchs** (nicht quantifiziert) (Snook et.al, 1977), und in **Produkten der Kohlegasifizierung** (Bridbord & French, 1978; Young et al., 1978). **I**m **Räucherrauch** wurde DB[a,l]P in Gehalten von 2 µg/kg verbranntes Holz (für B[*a*]P: wurden 74 µg/kg gemessen) (Maga et al., 1986) nachgewiesen.

2.2.2 Biologische Aktivität

Die kanzerogene und mutagene Wirkung von DB[*a,l*]P im Tierexperiment gilt als gesichert (IARC, 1983). DB[*a,l*]P gilt als einer der potentesten kanzerogenen PAK im Modell Mäusehaut (nach äußerlicher Applikation von 0,8 µmol) und der Brustdrüse der Ratte nach Injektion von 4 µmol in das Drüsengewebe (Cavalieri et al. 1989). Hierbei erwies sich DB[*a,l*]P um den Faktor 10 stärker krebserzeugend als B[*a*]P, bei gleichzeitiger hoher allgemeiner Toxizität (Cavalieri et al. 1991). Initiations-Promotionsexperimente an der Mäusehaut mit niedrigen DB[*a,l*]P-Dosen (0,25-1 nmol) bestätigen die starke kanzerogene Wirkung im Vergleich zu B[*a*]P, verbunden mit starker allgemeiner Toxizität (Higginbotham et al., 1993). *Syn*- und *anti*-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxide selbst besitzen mehr mutagenes Potential in *S. typh.* und V79-Zellen als die Fjord- bzw. Bay-Region-Dihydrodiolepoxide von B[*c*]PH und B[*a*]P (Seidel et al. 1994) erzeugen Tumore in neugeborenen Mäusen bei starker Toxizität, verglichen mit B[*c*]PH-DH-Epoxid und B[*a*]P-DH-Epoxid (Amin et al., 1995 1),2)).

2.2.3 Metabolismus

Aroclor- und phenobarbital-induzierte Rattenlebermikrosomen generieren aus DB[a,l]P neben DB[a,l]P-8,9-DH das DB[*a,l*]P-11,12-DH als Vorläufer des Fjord-Region-DH-Epoxids.

Mit DB[*a,l*]P sowie DB[*a,l*]P-11,12-DH konnte nach Aktivierung mit Rattenlebermikrosomen effiziente DNA-Adduktbildung nachgewiesen werden (Li et al., 1995). Lebermikrosomen aroclorinduzierter Ratten erzeugen 20-60-fach mehr Addukte mit Kalbsthymus-DNA als Lebermikrosomen nicht-induzierter Ratten, zusätzlich führten Inkubationen in Anwesenheit von α-Naphthoflavon (α-NF) zur Inhibierung der Adduktbildung, was als Hinweis auf die Beteiligung von CYP 450 1A1 und 1A2 an der Aktivierung gewertet werden kann (Arif et al., 1997).

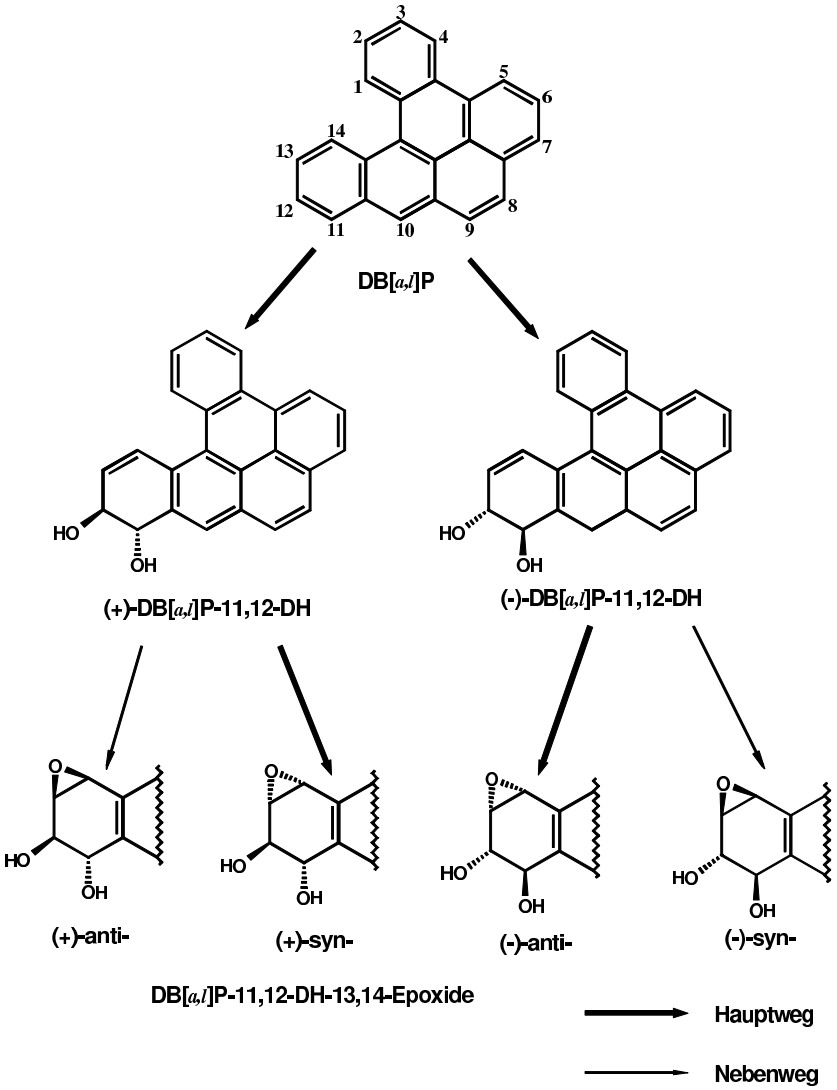
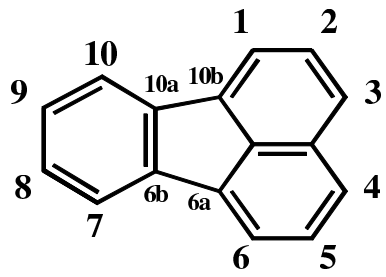


Abb. 2.2 Stereoselektive Aktivierung von DB[*a,l*]P zu stark kanzerogenen Fjord-Region-Diolepoxiden in humanen MCF-7-Zellen (nach Ralston et al., 1995)

Ralston et al. (1994, 1995) konnten nachweisen, daß humane MCF-7-Mammacarcinomzellen DB[*a,l*]P und DB[*a,l*]P-11,12-DH stereoselektiv zum 11,12-DH-13,14-Epoxid aktivieren (Abb.2.2) und DNA-Addukte vor allem mit Desoxyadenosin bilden.

V79-Zellen wurden mit DB[*a,l*]P bzw. dem *trans*-11,12-DH zusammen mit MCF-7-Zellen als aktivierendem System inkubiert. Mit DB[*a,l*]P sowie dem (-)-DB[*a,l*]P-11,12-DH konnten HPRT-Mutationen nachgewiesen werden, nicht jedoch mit dem (+)-11,12-DH (Ralston et al., 1997).

2.3 Fluoranthen



Fluoranthen (FLU) ist planar. Da es im Gegensatz zu den klassischen aus 6-Ringen aufgebauten PAK einen 5-Ring aufweist, bezeichnet man es als „nonalternierend“.

2.3.1 Vorkommen

FLU ist eine PAK-Hauptkomponente (IARC, 1983), die in **Zigarettenrauch, Stadtluft**, **Oberflächenwasser, Abwasser** und **Regenwasser** nachgewiesen wurde. FLU gehört zu den PAK-Leitsubstanzen, die bei PAK-Analysen standardmäßig erfaßt werden. Eine Reihe von FLU-Gehaltsdaten in Lebensmitteln sind verfügbar:

Lebensmittel	**FLU [µg/kg]**	**Referenz**
Fleisch, (gegrillt)	2-11	Lodovici et al., 1995
Geflügel (geräuchert)	0,3-3	Gomaa et al., 1993
Fisch (geräuchert) **mit externem Rauchgenerator** **traditionelle Räucherung**	 0,02-0,4 3-16	 Lodovici et al., 1995 Gomaa et al., 1993
Flüssigrauch	0,8-5,8	Gomaa et al., 1993
Gemüse	1-24	Wickström et al., 1986

2.3.2 Biologische Aktivität

FLU ist im Nager nicht oder nur sehr schwach kanzerogen. In mehreren Studien, bei denen FLU in Dosen von 0,1 mg bis 50 mg (wöchentlich auf Lebenszeit) auf die Haut von Nagern aufgetragen wurde, konnte keine kanzerogene Wirkung festgestellt werden (Wynder & Hoffmann, 1959; Bingham & Falk, 1969). FLU erzeugte jedoch Lungentumore in Mäusen nach Applikation der Substanz intraperitoneal (1-15 Tage nach der Geburt) (Wang & Busby, 1993). Fluoranthen-DNA-Addukte wurden in Mäusen nach intraperitonealer Gabe einer tumorgenen Dosis vor allem in der Lunge, weiter in Herz, Leber und Niere nachgewiesen (Wang et al., 1995 a),b)). Van Duuren & Goldschmidt (1976) beobachteten eine Erhöhung der Tumorrate in B[*a*]P-behandelter Mäusehaut bei gleichzeitiger Applikation von Fluoranthen. Rice et al. (1984) wiesen unter gleichen Bedingungen eine Erhöhung der B[*a*]P-DNA-Adduktbildung auf.
In vitro erwies sich FLU als mutagen im Ames-Test mit S. typhimurium. TA 98 und TA 100 nach Aktivierung mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen (Hermann et al., 1980; LaVoie et al., 1982) sowie in humanen Lymphoblastoid HH-4-Zellen (Thilly et al., 1980).
Im Gegensatz zu FLU war das 2,3-DH-1,10b-Epoxid kanzerogen: Dosen von 2 µmol Fluoranthen-2,3-DH-1,10b-Epoxid erzeugen Tumore nach Injektion in die Brustdrüse der Ratte in 85% der behandelten Tiere (Hecht et al., 1995).

2.3.3 Metabolismus

Der Fluoranthen-Metabolismus in Lebermikrosomen von Mensch und Aroclor-induzierter Ratte wurde von Day et al., (1992) aufgeklärt. Beide Systeme generieren ein qualitativ ähnliches Metabolitenspektrum. Sowohl humane als auch Rattenlebermikrosomen generieren FLU-2,3-DH als Hauptmetaboliten. Humanlebermikrosomen generieren in weiteren Schritten insbesondere das *anti*-2,3-DH-1,10b-Epoxid und das korrespondierende Tetraol (Abb.2.3).

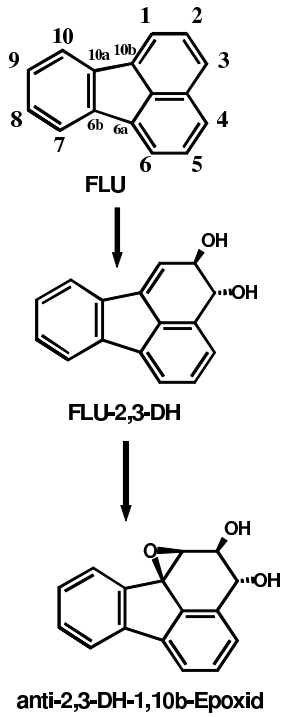
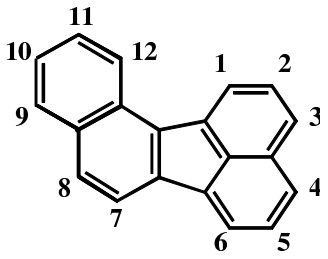


Abb.2.3 Aktivierung von Fluoranthen in humanen Lebermikrosomen (nach Day et al., 1992)

2.4 Benzo[*j*]fluoranthen



Benzo[*j*]fluoranthen (B[*j*]F) ist wie FLU ein nonalternierender PAK. und besitzt eine sterisch gehinderte, Bay-Region-ähnliche Struktur zwischen C-Atom 1 und 12.

2.4.1 Vorkommen

Benzo[*j*]fluoranthen (B[*j*]F) wurde nachgewiesen in **Zigarettenrauch** (0,15-0,2 mg/kg Kondensat (Wynder & Hoffmann, 1959) und **geräuchertem** sowie **gebratenem**

Fisch: max 23 µg/kg (Masuda & Kuratsune, 1971), sowie in **Speiseöl und Margarine**: max 11 µg/kg (Fábián, 1968).

2.4.2 Biologische Aktivität

Die kanzerogene Wirkung von B[*j*]F im Tierexperiment gilt als gesichert (IARC,1983).
B[*j*]F erzeugte bei der Maus Hautkarzinome nach Auftragen von B[*j*]F-Lösungen (0,01-0,5%) auf die Haut bei 100% der behandelten Tiere. (Wynder & Hoffmann, 1959). Auftragen von täglich 3-100 µg B[*j*]F auf die Haut von Albinomäusen über 20 Tage mit nachfolgender TPA-Promotion induzierte Tumore in 30-95% der behandelten Tiere (La Voie et al., 1982).

B[*j*]F-9,10-DH erwies sich als mutagen in Bakterien nach exogener Aktivierung (La Voie et al., 1979). Sowohl B[*j*]F-9,10-DH als auch das 4,5-DH werden *in vivo* in Mäusehaut (Rice et al., 1987) als auch *in vitro* nach Aktivierung mit S9-Mix der Ratte (La Voie et al., 1991) generiert. Das 4,5-DH erwies sich als der potentere Tumorinitiator der beiden Dihydrodiol-Metabolite (Rice et al. 1987) und bildete mehr DNA-Addukte in Mäusehaut als das 9,10-Dihydrodiol (La Voie et. al. 1991). Im Gegensatz dazu ist das „Pseudo-Bay-Region"-B[*j*]F-9,10-DH-Epoxid ein potenter Tumorinitiator nach direkter Injektion in das Brustdrüsengewebe der Ratte (Hecht et al., 1996), auch B[*j*]F-4,5-Diolepoxid erwies sich als potentes Kanzerogen, aber mit geringerer Aktivität als das 9,10-DH-Epoxid.

2.4.3 Metabolismus

In Rattenleber-Präparationen konnten das 9,10-Dihydrodiol und das 4,5-DH als Metaboliten von B[*j*]F nachgewiesen werden (Hecht et al., 1980; LaVoie et al., 1991) (Abb. 2.4).

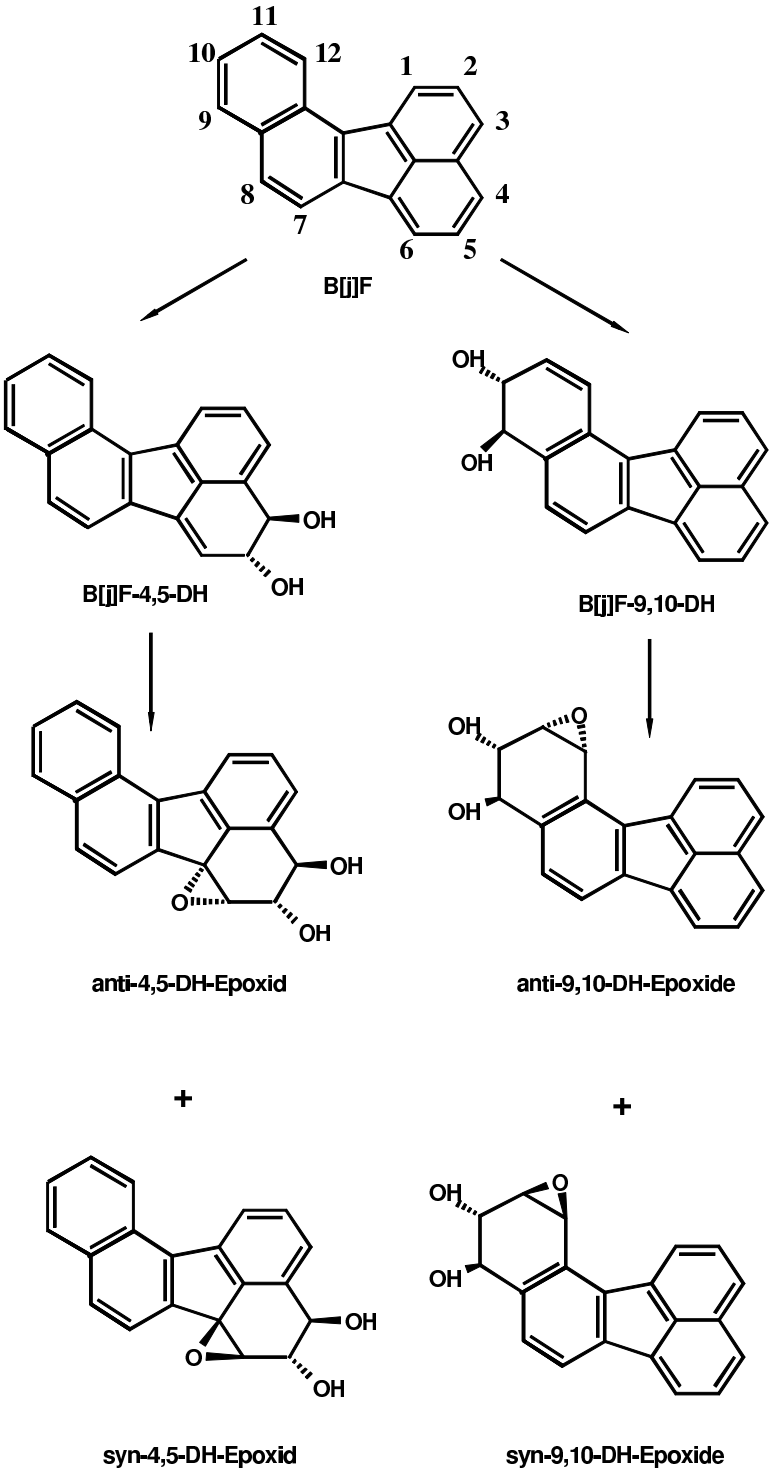


Abb.2.4 Aktivierung von B[*j*]F zu genotoxischen Metaboliten (nach LaVoie et al., 1991)

2.5 Humane CYP450-Enzyme

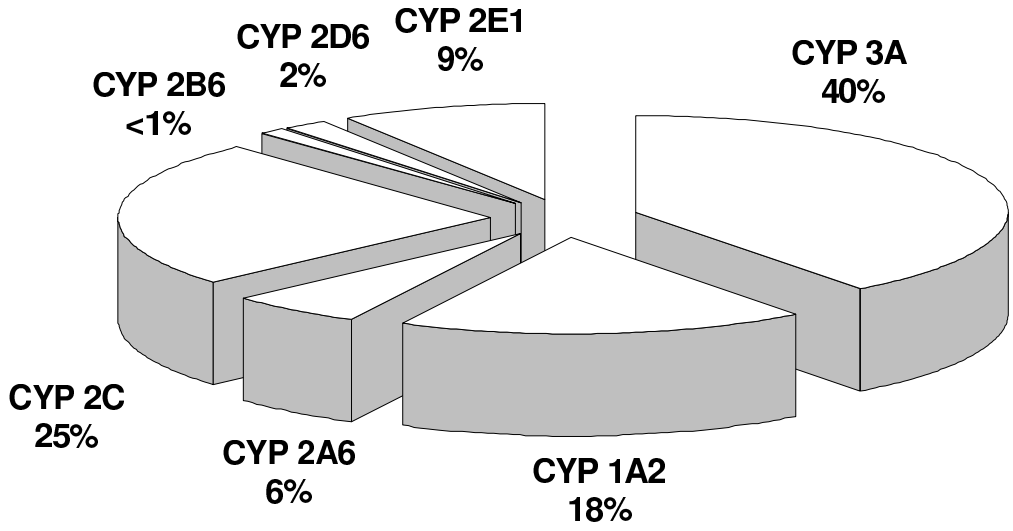


Abb.2.6 CYP 450-Isoenzymmuster in der Humanleber (nach Cresteil, 1998)

Die Unterschiede im Gesamtgehalt an CYP 450-Enzyme zwischen einzelnen Individuen variieren ungefähr um den Faktor 3 (Beaune et al, 1986, Distlerath, 1987, Guengerich, 1991) und sind damit deutlich geringer als die zwischen einzelnen CYP 450-Isoformen, die um 1-3 Größenordnungen variieren können (Guengerich, 1994).
Von den extrahepatischen Geweben weisen v.a. Lunge und der Nasen-Rachenraum beachtliche Mengen an CYP 450 auf. Beide Orte sind Zielorgane für Xenobiotika, die über die Atemluft aufgenommen werden (Guengerich, 1994).
Das Spektrum der exprimierten CYP 450-Enzyme variiert mit dem Alter. Die CYP 450-Isoenzymverteilung in der Leber des Erwachsenen ist in Abb. 2.6 wiedergegeben. CYP 2D6 und CYP 2E1 entwickeln sich in den ersten Stunden nach der Geburt, während CYP 3A4 und CYP 2C-Enzyme erst während der ersten Woche entwickelt werden. CYP 1A2 wird erst nach dem ersten Lebensmonat gebildet (Cresteil, 1998). Der CYP 450-Gesamtgehalt in der menschlichen Lunge beträgt mit 2pmol/mg Protein (Wheeler und Guenthner, 1991) ca. 0,1% des Gehaltes in der Leber (Shimada et al., 1989). CYP 1B1 ist ein Isoenzym, das in fötalem Herz und fötaler Niere stark exprimiert wird. (Shimada et al., 1996 2)). In fötaler Leber wird insbesondere CYP 3A7 exprimiert. Die Gehalte der 1A und 2E-Unterfamilie sind hingegen extrem niedrig (Cresteil, 1998).

2.5.1 CYP 1A-Isoenzyme

Die Isoenzyme der CYP 1A-Unterfamilie CYP 1A1 und CYP 1A2, sind zu 70% in der Aminosäuresequenz identisch. (Guengerich, 1994). Der Gesamtgehalt von CYP 1A2 in der menschlichen Leber kann etwa um den Faktor 40 variieren (Schweikl et al., 1993; Rendic & Di Carlo, 1997). CYP 1A1 ist vor allem in extrahepatischem Gewebe, CYP 1A2 in der Leber lokalisiert (McManus et al., 1990; Shimada et al., 1992; 1996; Schweikl et al., 1993). Sowohl humanes CYP 1A1 als auch CYP 1A2 sind unter der Kontrolle des Ah-locus, wobei TCDD ein potenter Induktor für CYP 1A-Enzyme darstellt (Whitlock, J.P. Jr., 1993; Ioannides und Parke, 1993; Rowlands & Gustaffson, 1997). Weitere Induktoren sind PCBs, aromatische und heterocyclische aromatische Amine (Rendic und Di Carlo, 1997). In extrahepatischem Gewebe wie Placenta und Lunge ist CYP 1A1 durch Zigarettenrauch induzierbar, wenngleich der Effekt beachtlich variiert (Bartsch et al., 1992, 1995; Anttila et al., 1992).
Beide Isoenzyme besitzen ähnliche Substratspezifitäten und vermögen mehr als 90% aller bekannten Kanzerogene zu aktivieren (Rendic und Di Carlo, 1997). CYP 1A2 gilt allgemein als eines der Hauptenzyme in der Humanleber, die an der Bioaktivierung genotoxischer Substanzen aus Zigarettenrauch beteiligt sind.
CYP 1A-Enzyme katalysieren insbesondere verschiedene Oxidationen planarer Moleküle. Hierzu zählen polycyclische aromatische Kohlenwasswerstoffe (McManus et.al, 1990; Roberts-Thomson et al., 1993; Guo et al., 1995).
B[*a*]P und andere polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe wurden als Substrate für humanes CYP 1A1 und 1A2 beschrieben (Guengerich 1991; Shimada et. al., 1989; McManus et. al., 1990). Aufgereinigtes CYP 1A1 aus humanem Lungengewebe zeigte sich hochaktiv für die Transformierung von B[a]P-7,8-DH zum 7,8-DH-9,10-Epoxid (Shimada et al., 1996 1)). Eine maßgebliche Beteiligung von CYP 1A1 und 1A2 am Metabolismus von B[a]P (insbesondere dessen 3-Hydroxylierung, 7,8- und 9,10.Epoxidierung) sowie 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (Bildung von 1,2-Dihydrodiol und 3,4-Dihydrodiol) konnte gezeigt werden (Bauer et. al., 1995; Shou et al., 1996 1)). Auch für Chrysen und 5- bzw. 6- Methylchrysen wurde die Beteiligung von CYP 1A1 und 1A2 an der Aktivierung gezeigt (Köhl et al., 1996 1), 2)).

Aromatische Amine sind eine weitere Gruppe von Verbindungen, die CYP 1A1/1A2-abhängig aktiviert werden (McManus et.al, 1990; Butler et al., 1989). Ein typisches Substrat hierfür ist 2-Aminoanthracen (Yamazaki et al., 1994; Shimada et al., 1994).
Ein weiteres Beispiel für eine CYP 1A2-vermittelte Reaktion ist die hepatische N^3-Demethylierung von Koffein (Butler et al., 1989; Hammons et al., 1997), sie hat für die nichtinvasive Bestimmung des CYP 1A2-Status von Individuen Bedeutung erlangt.
α-Naphthoflavon ist ein sehr effektiver kompetitiver Inhibitor für CYP 1A1 und 1A2 (Shimada, 1989; Butler, 1989), Auch eine Reihe natürlich vorkommender Flavonoide wie Naringenin und Quercetin inhibieren das Enzym (Yang et al., 1992).

2.5.2 CYP 3A-Isoenzyme

Die CYP 3A-Unterfamilie ist beim Menschen insbesondere in der Leber mit mehreren Isoenzymformen vertreten. CYP 3A4 ist das Hauptenzym. Es spielt eine wesentliche Rolle im humanen Metabolismus von Xenobiotica, mit einer sehr breiten Substratspezifität. Die historische Bezeichnung $P450_{NF}$ basiert auf seiner Fähigkeit zur N-Oxidation von Nifedipin (Guengerich, 1995 2)). Es wird bevorzugt in der Leber von Erwachsenen exprimiert. 30% aller Erwachsenen exprimieren zusätzlich CYP 3A5 (Guengerich, 1991; Shimada, 1989), In der fetalen Leber wird insbesondere CYP 3A7 exprimiert. Der durchschnittliche Gehalt an CYP 3A4 am Gesamt-CYP 450 in der menschlichen Leber beträgt 25-28% und kann in Einzelfällen bis zu 70% betragen (Rendic & Di Carlo, 1997; Joannides et al., 1992; Guengerich, 1995 1),2)). Extrahepatisch wird CYP 3A4 vor allem im Dünndarm gefunden und besitzt daher große Bedeutung beim Metabolismus oral aufgenommener Xenobiotika. Deren Metabolisierung kann bereits bei der Passage der Darmwand stattfinden (Kaminski et al., 1992). Weiterhin wurde trotz der breiten Substratspezifität eine beachtliche Regio- und Stereoselektivität bei den Oxidationsreaktionen festgestellt.
Zu den wichtigsten Umsetzungen zählen auch die Epoxidierung und Hydroxylierung von Aromaten. Die Aktivierung von B[*a*]P-7,8-DH zum Dihydrodiolepoxid ist eine typische CYP 3A4-vermittelte Reaktion (Bauer et al., 1995). CYP 3A4 ist neben CYP 1A2 das Hauptenzym bei der Aktivierung von Aflatoxin B_1 (Kitada et al, 1990).

α-NF ist Substrat für CYP 3A4 und stimuliert außerdem eine Reihe von Reaktionen, u.a. den Metabolismus von Phenanthren und die Aktivierung von B[*a*]P-7,8-DH in humanem, rekombinantem CYP 3A4, Lebermikrosomen und hochaufgereinigten CYP 3A4 in einem rekonstituierten System (Shimada et al., 1989; Brian et al., 1990). Weiterhin wird die metabolische CYP 3A4-abhängige 3-Hydroxylierung von B[*a*]P und die 8,9-Epoxidierung von Aflatoxin B_1 stimuliert (Buening et al. 1978; 1981). Für die modulierende Wirkung werden zwei Mechanismen diskutiert: Die Substratbindungsstelle von CYP 3A4 akzeptiert sehr große Moleküle wie Cyclosporin A (Guengerich et al., 1995 2)). Shou et al. (1996 1), 2)) fanden Hinweise, daß PAK wie Phenanthren und Chrysen simultan mit α-NF im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden werden, wobei die Substrate sich nicht kompetitiv inhibieren. Jedoch wird auch ein allosterischer Mechanismus für die stimulierende Wirkung von α-NF auf CYP 3A4 diskutiert. Man nimmt an, daß α-NF in CYP 3A4 eine Konformationsänderung bewirkt, die zu einer Verstärkung der Sauerstoffübertragungsprozesses führt (Ueng et al., 1997; Guengerich et al., 1995 2)).
Troleandomycin inhibiert effektiv CYP 3A4-vermittelte Reaktionen (Chang et al., 1994), wie u.a. für die Aktivierung von Methadon gezeigt wurde (Irbarne et. al., 1996). Als spezifische katalytische Reaktion zur Erfassung der CYP 3A4-Aktivität gilt die N-Oxidation von Nifedipin. Zu beachten ist, daß bei der Bestimmung der Nifedipinoxidaseaktivität als Maß für den CYP 3A4 Gehalt auch andere Isoenzyme der CYP 3A-Subfamilie mit ähnlichen Umsatzraten wie CYP 3A5 miterfaßt werden (Gillam et.al, 1995).

2.5.3 CYP 1B1

CYP 1B1 ist weitverbreitet in fetalem Gewebe, und im extrahepatischen Gewebe von Erwachsenen. Es wird vor allem in der Niere, Uterus und Brustdrüse exprimiert (Shimada et al., 1996 2)). Der Gehalt von CYP 1B1 in der menschlichen Leber beträgt weniger als 1% (Rendic und Di Carlo, 1997). In der menschlichen Lunge konnte CYP 1B1 nicht nachgewiesen werden (Hakkola et al., 1997). Das Isoenzym ist an der Aktivierung einer ganzen Reihe von Umweltkanzerogenen und Mutagenen beteiligt (Shimada et al., 1996 2)).

CYP 1B1 ist *in vitro* induzierbar durch TCDD (Sutter et al., 1994; Hakkola et al., 1997). Es metabolisiert 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (Guengerich, 1994) und katalysiert die Oxidation von PAH-Dihydrodiolen, Nitroaromaten und aromatischen Aminen (Rendic & Di Carlo, 1997).
CYP 1B1 katalysiert die B[*a*]P-3-Hydroxylierung (Shimada et al., 1997). Verschiedene prokanzerogene PAK-Dihydrodiole lassen sich durch CYP 1B1 im *umu*-Test zu genotoxischen Verbindungen aktivieren. DB[*a,l*]P-11,12-DH induziert nach Aktivierung mit rekombinantem CYP 1B1 in *S.typhimurium* TA 1535 pSK 1002 die stärkste *umu*-Antwort, gefolgt von B[*a*]P-7,8-DH und Chrysen-1,2-DH und B[*c*]PH-3,4-DH (Shimada et al., 1996).

2.5.4 Weitere CYP 450 Isoenzyme der menschlichen Leber: CYP 2A6, 2C19, 2D6 und 2E1

CYP 2A6 ist das einzige Enzym der 2A Unterfamilie das in Humanleber exprimiert wird. Die Gehalte sind vergleichsweise niedrig und Induzierbarkeit konnte bisher nicht beobachtet werden. Ein genetischer Polymorphismus wurde beobachtet. Unter anderem konnte die Beteiligung von CYP 2A6 an der Aktivierung von 6-Aminochrysen beobachtet werden, jedoch erscheint der Beitrag wegen der niedrigen Gehalte von untergeordneter Bedeutung. (Guengerich, 1995 2)). Es konnte gezeigt werden, daß CYP 2A6 auch an der Aktivierung von N-Nitrosodialkylaminen und tabakspezifischen N-Nitrosaminen beteiligt ist (Yamazaki et al., 1992; Tiano et al., 1994).
Die 2C-Subfamilie ist die vielfältigste Subfamilie in der menschlichen Leber, die bisher beschrieben wurde. Für **CYP2C19** wurden ein genetischer Polymorphismus sowie Induzierbarkeit beschrieben (Guengerich, 1995 2)). Substrate sind z.B. Warfarin und Barbiturate (Rendic & Di Carlo, 1997).
Das einzige humane Enzym der CYP 2D-Familie ist **CYP 2D6**. Bei diesem Enzym konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß ein CYP-Enzym unter der Regulation eines einzelnen Gens steht. Der CYP 2D6-Polymorphismus wurde intensiv unter-

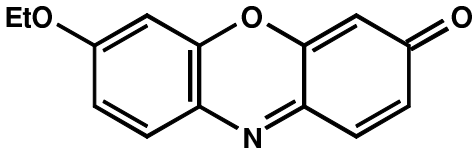
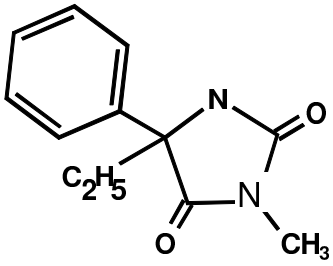
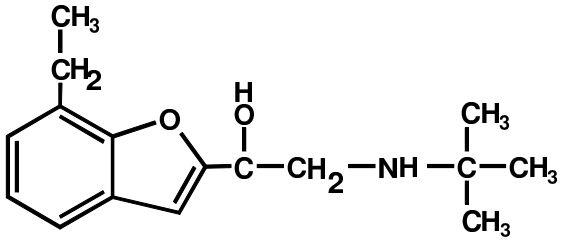
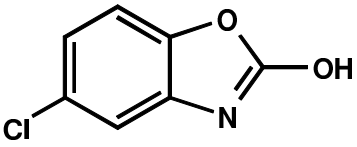
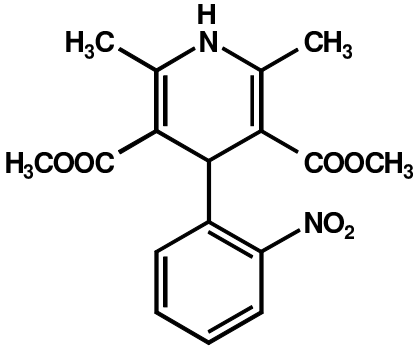
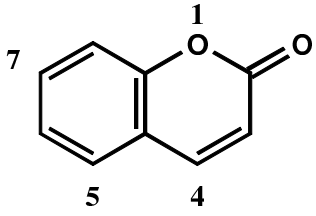
sucht. Beachtliche Unterschiede bezüglich CYP 2D6 wurden auch zwischen einzelnen Populationen (Afrikaner, Asiaten, Chinesen, Kaukasiern) (Guengerich, 1995 2)) gefunden. Eine Reihe von Individuen besitzen außerordentlich hohe CYP 2D6-Aktivität (Johansson, I.et al., 1993). Der CYP 2D6-Anteil am Gesamt-CYP 450 in der menschlichen Leber beträgt bis zu 2,5% wobei die Gehalte zwischen einzelnen Individuen 1000-fach variieren können (Rendic und Di Carlo, 1997). Substrate für CYP 2D6 sind Codein und kanzerogene tabakrauchspezifische N-Nitrosamine (z.B. NNK) (Guengerich, 1995; Rendic & Di Carlo, 1997).

CYP 2E1 ist das einzige Enzym der 2E-Unterfamilie beim Menschen und Hauptkatalysator für die Oxidation einer Reihe von Substanzen, mit kanzerogenem Potential und relativ kleinem Molgewicht. Hierzu zählen aromatische Verbindungen wie Benzol und Styrol ebenso wie Chloroform (Guengerich, 1991). Der CYP 2E1-Gehalt in der menschlichen Leber variiert um eine Größenordnung (Guengerich, 1995 2)). Es wird in der Leber und einer Reihe extrahepatischer Gewebe exprimiert. Die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd wird durch CYP 2E1 katalysiert. In Folge von Induktion ist der Gehalt von CYP 2E1 bei Alkoholikern erhöht. CYP 2E1 konnte als einer der Haupkatalysatoren für die Aktivierung von N-Nitrosodialkylaminen und tabakspezifischen N-Nitrosaminen in menschlichen Lebermikrosomen identifiziert werden (Yamazaki et al., 1992 2); Tiano et al., 1994).

2.5.5 Bestimmung einzelner Isoenzymaktivitäten

Spezifische Umsetzungen von Substraten, die bevorzugt von einzelnen CYP-Isoformen katalysiert werden (CYP 450-Markeraktivitäten), können zur Bestimmung einzelner CYP 450-Isoenzyme, z.B. in Gewebepräparationen, herangezogen werden. Eine weitere Möglichkeit bieten CYP 450-Isoenzym-spezifische Hemmstoffe. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten CYP 450-Markeraktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten CYP 450-Isoformen.

Tab. 2.1 Markeraktivitäten für verschiedene CYP 450-Isoenzyme (Guengerich, 1995 1))

CYP 450-Isoenzym	Markeraktivität	Substrat
1A2	7-Ethoxyresorufin-O-deethylierung	
2C19	(S)-Mephenytoin 4'-hydroxylierung	
2D6	Bufuralol-1'-hydroxylierung	
2E1	Chlorzoxazon-6-hydroxylierung	
3A4	Nifedipin-N-Oxidation	
2A6	Coumarin-7-hydroxylierung	

2.6 *In vitro*-Testsysteme

2.6.1 Rekombinante humane CYP 450-Isoenzyme

Reine CYP-Isoformen können neben der Aufreinigung aus Gewebe durch Expression in Bakterien- oder Hefezellen gewonnen werden. Diese rekombinanten CYP-Isoenzyme sind frei von allen eng verwandten Isoformen (Guengerich, 1996). Zur Optimierung der CYP 450-Expression wurde das als Membrananker fungierende N-terminale hydrophobe Ende des Proteins modifiziert bei gleichzeitiger Annahme, daß diese Sequenz keine direkte Rolle beim Reaktionszyklus, bei der Substratbindung oder Kopplung mit accessorischen Proteinen besitzt (Guengerich, 1996 2)).
Die in Mikroorganismen exprimierten CYP 450-Isoenzyme können z.B. durch Ionen-Austauschchromatographie aufgereinigt und als rekonstituiertes System oder auch direkt als Membranpräparationen eigesetzt werden, wobei die Aktivität in den bakteriellen Membranen niedriger ist als in den rekonstituierten Systemen mit aufgereinigtem Enzym (Guo, et al., 1994; Gillam et al., 1995). Die CYP 450-Expression kann zusammen mit NADPH Oxidoreductase erfolgen (Guengerich, 1995 2)).

2.6.2 Bestimmung von Genotoxizität und Mutagenität

2.6.2.1 Die SOS-Reparaturenzymkaskade in Prokaryoten

Die SOS-Antwort ist ein in Folge eines genotoxischen Schadens induzierter DNA-Reparaturmechanismus, der in Bakterien nachgewiesen wurde. DNA-Schäden führen zur Blockade der DNA-Polymerase III was einen Anstieg des Nukleotidpools zur Folge hat. Am Ende der SOS-Reparaturenzymkaskade bindet ein Fragment des gebildeten UmuD-Proteins (UmuD') sowie das UmuC-Protein an die DNA-Polymerase III und ermöglicht dadurch eine DNA-Replikation über den Schaden weg, unter Inkaufnahme einer möglichen Basenfehlpaarung an der defekten Stelle.

Das Rec A-Protein spielt eine Schlüsselstellung bei der Regulation der SOS-Antwort. Es wird vermutlich durch Oligonukleotide und einzelsträngige DNA als Aktivatoren in seine Aktive Form (Rec A*) überführt. Rec A* besitzt Protease-Aktivität und spaltet das Protein Lex A. Lex A ist Repressor für mehrere SOS-Gene. Hierzu gehören unter anderem *recA* und *umuDC*. Die RecA*-vermittelte Spaltung von LexA führt daher zur verstärkten Bildung der Proteine RecA, UmuD und UmuC. RecA* ist weiterhin für die Bildung des Spaltproduktes UmuD' aus UmuD verantwortlich und ermöglicht dadurch die Reinitiation der DNA-Synthese nach dem Replikationsblock (Abb. 2.7) (Guengerich, 1996 1))

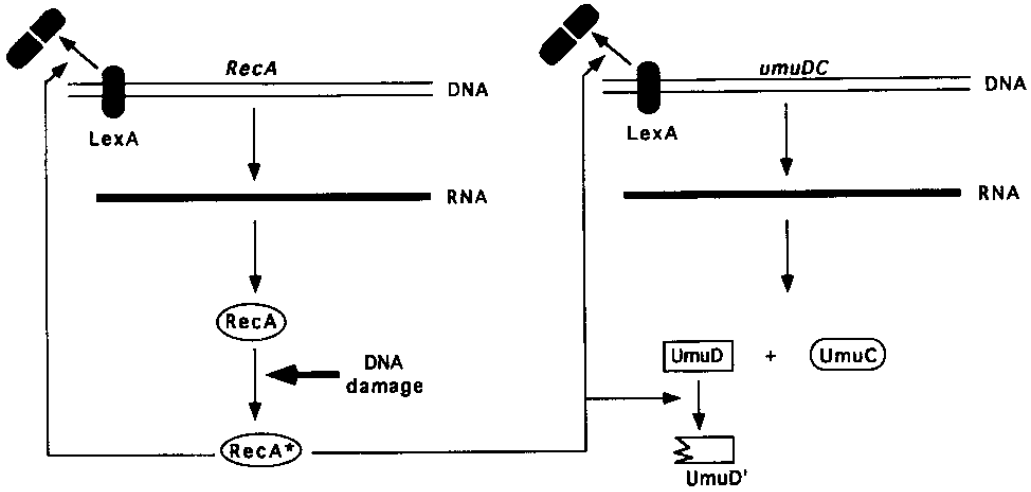


Abb. 2.7 Regulation der SOS-Antwort und des *umuDC* operons durch LexA und RecA (Guengerich 1996 1))

2.6.2.2 Bestimmung der Xenobiotika-induzierten Genotoxizität in gentechnisch modifizierten *Salmonella typhimurium*-Stämmen

Salmonella typhimurium TA 1535 ist in Folge eines genetisch bedingten Membrandefekts für aktivierte Mutagene besonders durchlässig. Als Reportergen für die Aktivierung der SOS-Reparaturenzymkaskade wurde ein Plasmid eingeführt, das die *umuC*-regulatorische Einheit, verbunden mit einem *lacZ*-Gen trägt. Die Aktivierung der Fremdstoffe erfolgt extern durch Säugerenzyme, die mit Bakterien gemischt im Inkubatinsansatz vorliegen.

Die Bindung der aktivierten Kanzerogene an die Bakterien-DNA leitet SOS-Antwort ein und aktiviert damit die *umu*-Region des Reprtergens, was in der Produktion des *lacZ*-Gen-Produkts, der ß-Galaktosidase resultiert, die colorimetrisch bestimmt werden kann (Yamazaki et al, 1992 1); Shimada et al., 1994 1), 2), 3), Oda et al., 1985) (Abb.2.8).

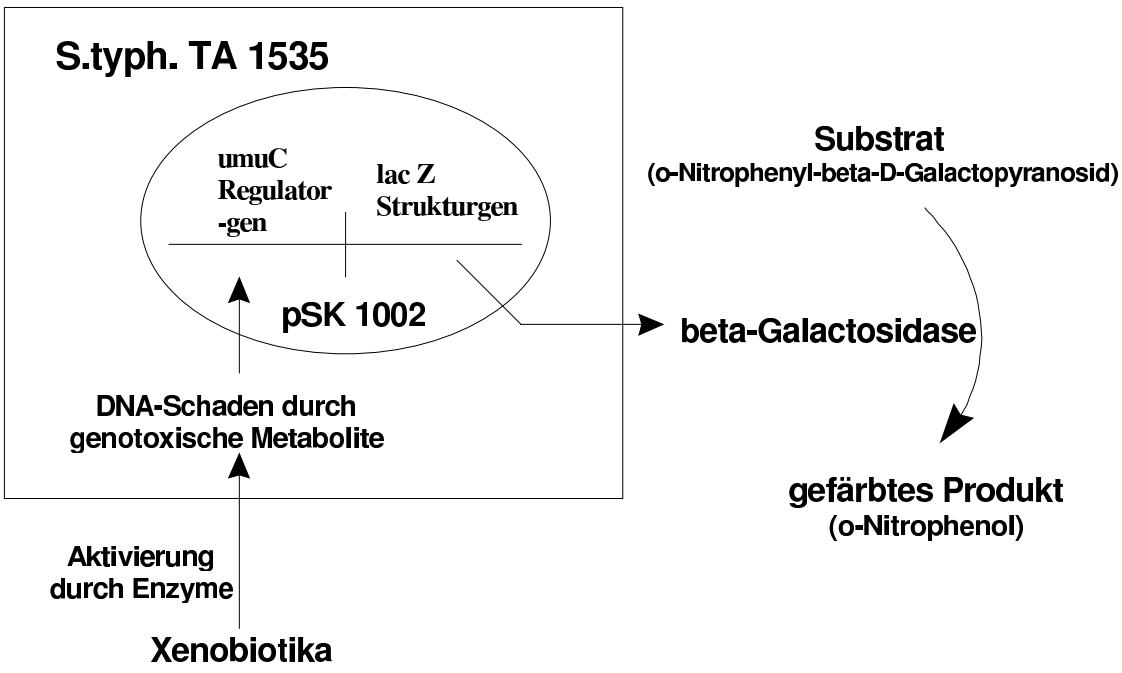


Abb.: 2.8 Prinzip des *umu*-Tests mit S. typh TA 1535 pSK 1002. (nach Guegerich, 1996 1), modifiziert)

Vorteile des Tests sind die kurze Inkubationszeit, bei der bakterielle Kontaminationen keine Rolle spielen. Infolgedessen müssen die zur Aktivierung verwendeten Gewebepräparationen nicht vor der Inkubation sterilisiert werden. Die Experimente können in flüssigem Medium durchgeführt werden. Koloniebildung ist nicht erforderlich und eine Testserie benötigt ca 8-10 Stunden.
Im Stamm *S. typh.* NM 2009 wurde zusätzlich bakterielle N-Acetyltransferase in den pSK 1002-Plasmid inkorporiert. Aromatische Amine, die bei ihrer metabolischen Aktivierung eine Acetylierung erfahren, können so mit größerer Empfindlichkeit detektiert werden (Guengerich, 1996 1); Shimada, 1994 3)).
Mutagenitätsdaten aus *Ames*-Mutagenitätstests (Ames, 1979) korrelieren gut mit Genotoxizitätsdaten aus *umu*-Tests (Nakamura et al, 1987; Guengerich, 1996).

2.6.3 Bestimmung von HPRT-Vorwärtsmutationen in V79-Zellen (Lungenfibroblasten des männlichen syrischen Hamsters)

V79-Zellen sind Lungenfibroblasten des männlichen syrischen Hamsters und besitzen einen stabilen Karyotyp von 21 Chromosomen und eine Generationszeit von nur 12-14 Stunden. Sie weisen in ihrem Genom das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Gen auf und sind daher für den Nachweis Xenobiotica-induzierter HPRT-Mutationen *in vitro* geeignet. (Morton und Margison, 1988). In V79-Zellen konnten u.a. Cytochrom P450-Reduktase (3200 pmol/mg Protein x min), mikrosomale Epoxidhydrolase (118 pmol/mg Protein x min) und Glutathion-S-transferase (637 000 pmol/mg Protein x min) nachgewiesen werden (Glatt, 1987; 1993; Doehmer, 1990).

2.6.3.1 V79 h3A4 hOR-Zellen

Die Substratspezifitäten einzelner CYP-Isoenzyme lassen sich in V79-Zellen untersuchen, die das entsprechende Isoenzym exprimieren (Doehmer & Jakob, 1994).
V79-Zellen besitzen nur minimale CYP 450-Aktivität und eignen sich daher zur Transfektion mit einem Vektor, der die cDNA für humanes CYP 3A4 enthält. Zusätzlich wurde der Promotor des SV40-Virus, der eine konstitutive Expression des nachfolgenden Strukturgens gewährleisten soll, sowie ein Neomycinresistenzgen eingeführt. Durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Geneticinsulfat-418, einem Neomycinderivat, können die transfizierten Zellen ausselektiert werden. Humane NADPH-Oxidoreductase wird zusätzlich exprimiert. (Schneider et al., 1996)

2.6.3.2 HPRT-Genmutationstest

Der Zelle stehen 2 Wege zur Gewinnung von Purinnukleotiden zur Verfügung:
1) *de novo* Synthese aus α-D-Ribose-5-phosphat und verschiedenen kleinen Bausteinen

2) Verwertung der im Stoffwechsel entstandenen freien Purinbasen

Hierbei ist die Schlüsselreaktion die Bildung der Nucleotide aus 5-Phospho-ribosyl-1-diphosphat und den entsprechenden Purinbasen. Die Reaktion wird katalysiert zum einen von der für Adenin spezifischen Adenin-Phosphoribosyltransferase, zum anderen durch die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, welche die Bildung von Inosinat aus Hypoxanthin und die Bildung von Guanylat aus Guanin katalysiert (Stryer, 1994). Erfährt nun das HPRT-Gen eine Vorwärtsmutation, wird die Hypoxanthinphosphoribosyltransferase nicht mehr exprimiert und Syntheseweg 1 tritt in den Vordergrund. Bietet man den Zellen nun Guaninanaloge wie 6-Thioguanin an, die durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase zu toxisch wirkenden Nukleotiden metabolisiert werden, so führt dies zum Absterben der Zellen mit intaktem HPRT-Gen, während die mutierten Zellen Resistenz gegen die Thioguaninanaloge aufweisen und in Kultur Zellkolonien ausbilden (Abb. 2.9).

Voraussetzung für die Sensitivität des Tests ist, daß das HPRT-Gen in den Zellen des männlichen Hamsters in nur einer aktiven Kopie vorhanden ist. Als Mutationensarten wurden bisher Einzelbasensubstitutionen, Rasterschubmutationen, Deletionen von wenigen Basenpaaren oder ganzen Exons, zum Teil auch Insertionen beobachtet (Glatt, 1993).

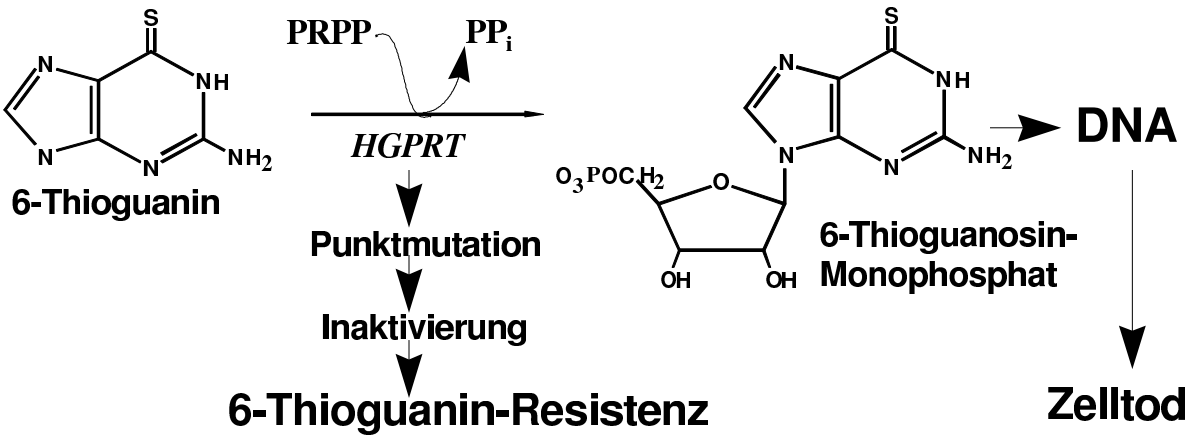


Abb. 2.9 Prinzip des HPRT-Genmutationstests

3 Problemstellung

Zur Substanzklasse der ubiquitär in der Umwelt vorkommenden PAK zählen eine Reihe von Verbindungen mit möglichem kanzerogenem Potential für den exponierten Menschen. Die Fjord-Region-Verbindung Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]PH) ist ein schwaches Kanzerogen im Nager, während die metabolisch gebildeten korrespondierenden Fjord-Region-Dihydrodiolepoxide zu den am stärksten biologisch aktiven PAK-Dihydrodiolepoxiden gehören. Eine Reihe von Studien ergaben, daß B[*c*]PH im Nager zwar effizient metabolisiert wird, jedoch nur sehr geringe Mengen des 3,4-Dihydrodiols als eigentliche Vorläuferverbindung der kanzerogenen Endprodukte generiert werden. Dies wird für das insgesamt geringe kanzerogene Potential der Verbindung B[*c*]PH im Nager verantwortlich gemacht.
Ob dieses tierexperimentell ermittelte Ergebnis eines relativ geringen kanzerogenen Potentials von B[*c*]PH auf den Menschen übertragbar ist, sollte anhand von Untersuchungen zum humanen Metabolismus von B[*c*]PH und B[*c*]PH-Dihydrodiolen überprüft werden. Zur biologischen Aktivierung der Verbindung beim Menschen ist bislang nur sehr wenig bekannt, jedoch sind gerade diese Informationen für die Risikoabschätzung von Bedeutung.

Daher standen im Mittelpunkt dieser Arbeit die Aktivierung von B[*c*]PH in menschlichem Gewebepräparationen.
Im einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:
-Wird B[*c*]PH in Präparationen aus menschlichem Gewebe effizient metabolisiert?
-Ist das B[*c*]PH-Metabolitenmuster vergleichbar mit dem bei Nagern gefundenen?
-Welche spezifischen CYP 450-Enzyme sind an der Aktivierung beteiligt, auch im Hinblick auf mögliche Risikogruppen?
-Werden B[*c*]PH-Dihydrodiole in menschlichen Gewebepräparationen zu genotoxischen und mutagenen Metaboliten aktiviert, und welche humanen CYP 450-Isoformen sind daran beteiligt?
-Wie groß ist das genotoxische und mutagene Potential der aktivierten Dihydrodiole im Vergleich zu Dihydrodiolen anderer PAK?
-Welche Rückschlüsse lassen sich daraus für die Risikoabschätzung ableiten?

18 humane Leber- und 11 humanen Lungenmikrosomenproben wurden zur Erfassung interindividueller Unterschiede der metabolischen Kapazität beim Menschen untersucht. Die einzelnen Leberproben wurden durch Bestimmung CYP 450-isoenzymspezifischer Aktivitäten in ihrem CYP 450-Isoenzymmusters charakterisiert. Zur Aufklärung des Metabolismus wurden Inkubationsexperimente mit den humanen Gewebepräparationen und tritiummarkiertem B[*c*]PH durchgeführt und gebildete Metabolite mittels HPLC/Radiodetektion identifiziert.

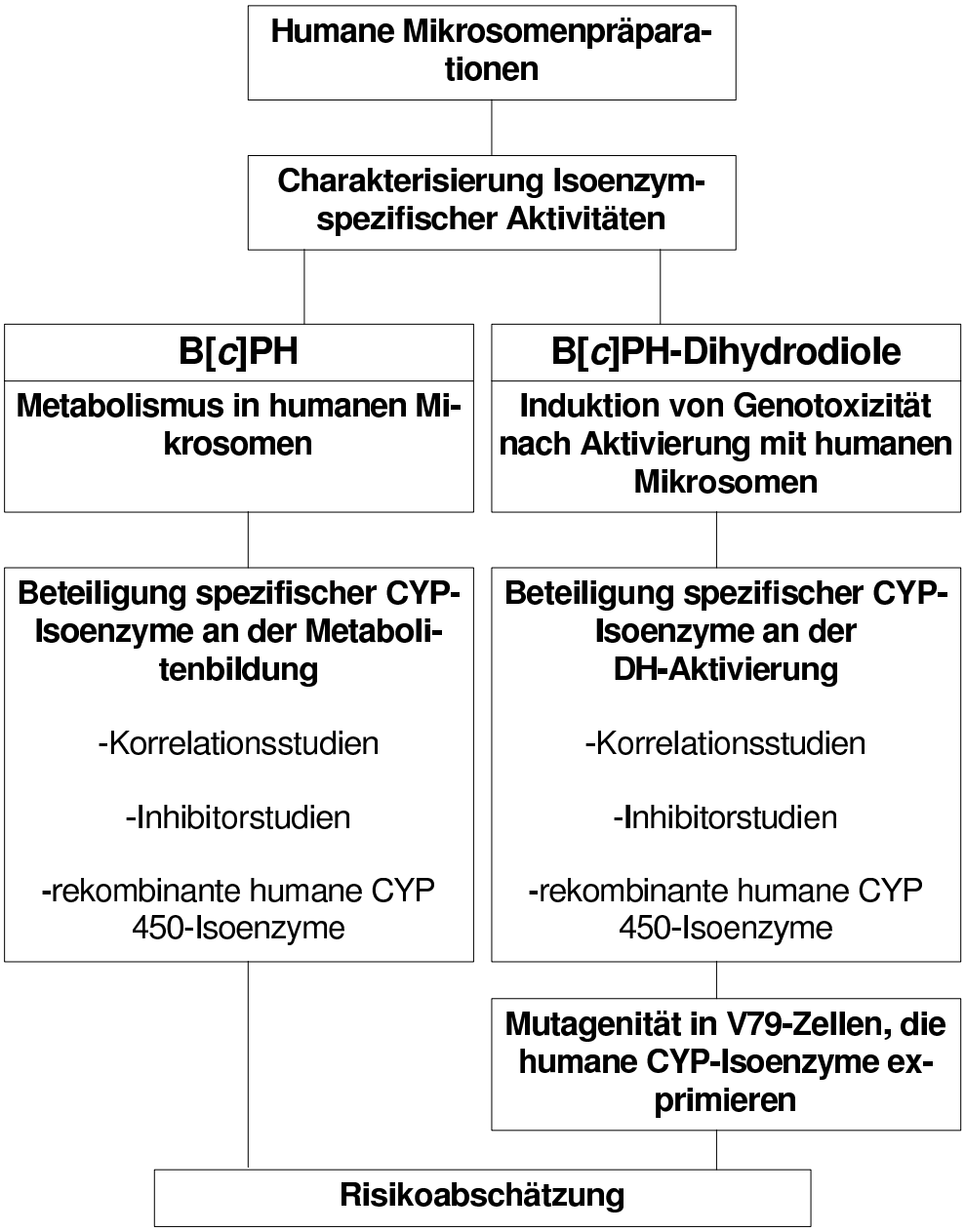


Abb.3.1 Strategie zur Untersuchung von B[*c*]PH

Weiterhin sollten die am B[c]PH-Metabolismus beteiligten Isoenzyme identifiziert werden. Hierzu wurden die gebildeten Metabolitenmengen mit zuvor bestimmten CYP 450-isoenzymspezifischen Markeraktivitäten der Lebermikrosomen korreliert. Weitere Hinweise sollten Inkubationen in Gegenwart isoenzymspezifischer Inhibitoren liefern. Ergänzend wurden rekombinante CYP 450-Isoenzyme mit B[*c*]PH inkubiert.
Die Ergebnisse im Nager wurden durch Untersuchungen mit verschiedenen Rattenleberpräparationen überprüft und zum weiteren Speziesvergleich wurden analog Schweine- und Rinderleberpräparationen getestet.

Das genotoxische und mutagene Potential der B[*c*]PH-Dihydrodiole sowie der vergleichend getesteten Verbindungen B[*a*]P-7,8-DH, DB[*a,l*]P-11,12-DH, B[*j*]F-2,3-DH und FLU-2,3-DH wurde in zwei Testsystemen untersucht, zum einen durch Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade in *S. typhimurium* TA 1535 pSK 1002 nach Aktivierung mit humanen CYP 450-Isoenzymen sowie durch Induktion von HPRT-Mutationen in V79-Zellen, die humanes CYP 450 exprimieren.
Die an der Dihydrodiol-Aktivierung beteiligten CYP 450-Isoenzyme sollten identifiziert werden. Hierzu wurde die mit den einzelnen Mikrosomenproben induzierte SOS-Antwort mit deren CYP 450-spezifischen Markeraktivitäten korreliert und der Einfluß isoenzym-spezifischer Inhibitoren auf die Induktion der SOS-Antwort getestet. Weiterhin wurde die SOS-Antwort nach Aktivierung der Dihydrodiole mit rekombinanten humanen CYP 450-Enzymen bestimmt.

Mit den Ergebnissen der Studie sollte eine verbesserte Risikoabschätzung möglich werden. Ein Strategieschema zur Untersuchung von B[*c*]PH ist in Abb. 3.1 wiedergegeben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 B[*c*]PH-Metabolismusstudien mit CYP 450-Enzymen

Zur Untersuchung des B[*c*]PH-Metabolismus wurde tritiummarkiertes B[*c*]PH mit humanen und tierischen Lebermikrosomen inkubiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der entstandenen Metabolite nach HPLC Trennung erfolgte mittels online-Radiodetektion. Hierzu wurde zunächst ein HPLC-Verfahren zur Trennung der B[*c*]PH-Metabolite entwickelt. Das tritiummarkierte Substrat wurde aufgereinigt sowie seine spezifische Aktivität bestimmt.

4.1.1 Methodenentwicklung zur HPLC-chromatographischen Trennung der B[*c*]PH-Metaboliten

Ein von Ittah et al. (1983) beschriebenes Verfahren zur Trennung verschiedener B[*c*]PH-Metabolite mittels Umkehrphasen (RP)-HPLC wurde weiter optimiert, wobei die Auftrennung der B[*c*]PH-Phenole verbessert werden konnte. 4-OH B[*c*]PH und 2-OH B[*c*]PH wurden von den übrigen Phenolkomponenten „Basislinien"-getrennt ; lediglich 3-OH B[*c*]PH koeluierte mit 5-OH-B[*c*]Ph. Ein Standardchromatogramm ist in Abb. 4.1 dargestellt.

4.1.2 Charakterisierung der [G-^{3}H] B[*c*]PH-Stammlösung

4.1.2.1 Aufreinigung

Humane Mikrosomen, insbesondere von extrahepatischem Gewebe lassen nur relativ geringe Substratumsatzraten und folglich geringe Metabolitenmengen erwarten. Die Verwendung einer hochreinen Substrates ist daher essentiell.

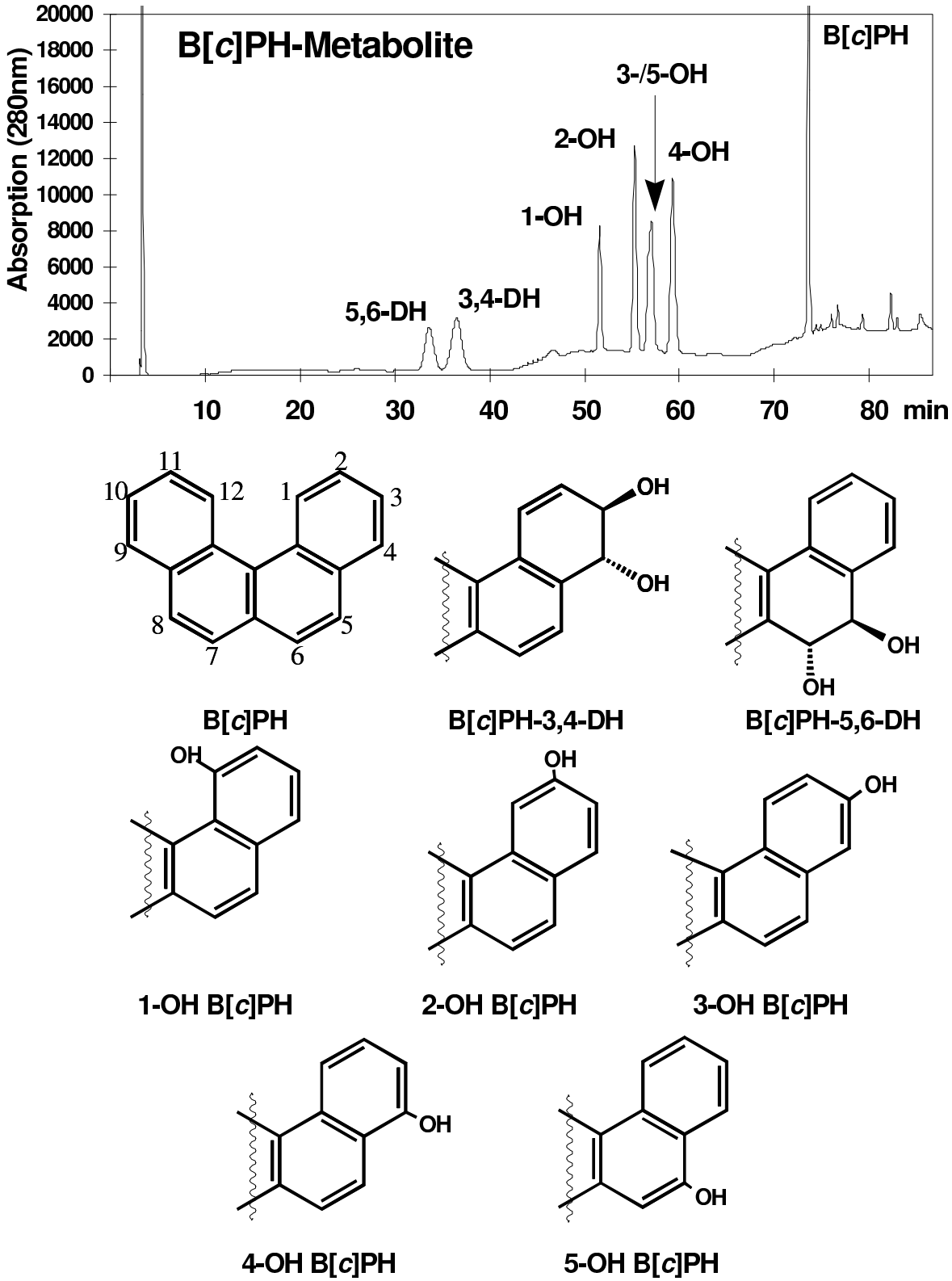


Abb.4.1 Chromatographische Trennung von B[*c*]PH-Metaboliten mittels RP-HPLC (Gradient: Methanol 40-100%/Wasser; Säule: RP 18)

Die Aufreinigung des Substrates erfolgte mit Hilfe des unter 6.6.1.1 beschriebenen HPLC-Normalphasensystems (Abb. 4.2). Die Reinheit des Substrates war nach Auf-

reinigung >99%; insbesondere Signale im Bereich der B[*c*]PH-Phenole konnten eliminiert werden.

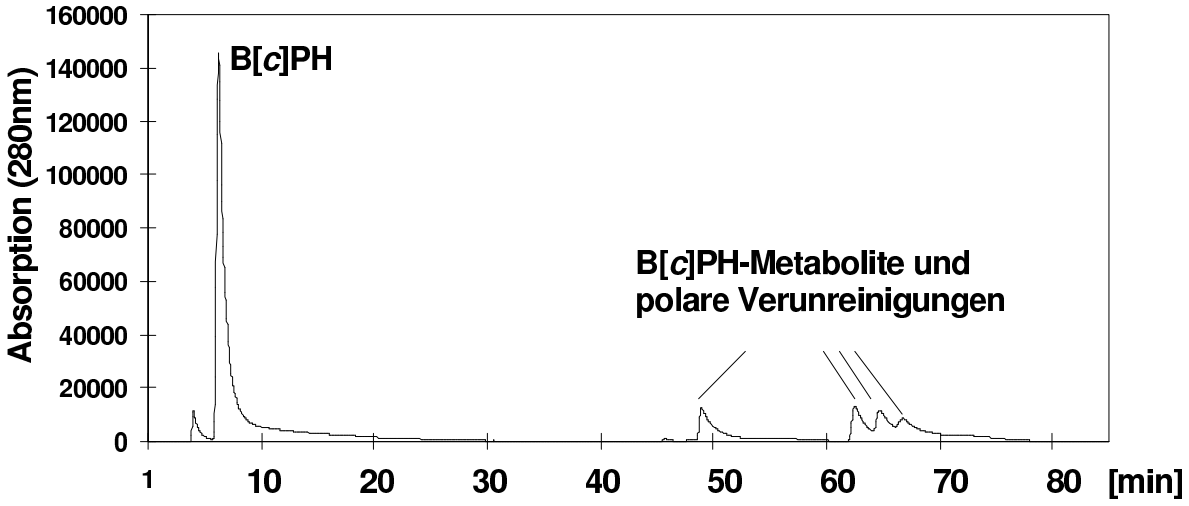


Abb. 4.2 Abtrennung von polaren Verunreinigungen in der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung mittels Normalphasen-HPLC

4.1.2.2 Konzentration und spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität des Substrates ist für die Nachweisempfindlichkeit der Methode mitentscheidend.

Für die ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung wurde eine Konzentration von 10,0 mM sowie eine spezifische Aktivität von 0,1Ci/mmol bestimmt. Zum Vergleich sind die spezifischen Aktivitäten tritiummarkierter Substrate aus früheren Studien in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tab. 4.1 Spezifische Aktivitäten tritiummarkierter PAK in Metabolismusstudien

Substrat	spezifische Aktivität	Referenz
5-Methylchrysen	0,3 Ci/mmol	Köhl et al., 1996
6-Methylchrysen	0,6-3 Ci/mmol	Köhl et al., 1996
B[*a*]P	1,3 Ci/mmol	Staretz et al., 1996

Wie aus Tabelle 4.1 zu ersehen, liegt die ermittelte spezifische Aktivität des ^{3}H-B[*c*]PH in der gleichen Größenordnung wie die anderer tritiummarkierter PAK aus früheren Studien.

4.1.3 Charakterisierung der Mikrosomen

Tierische sowie humane Lebermikrosomen wurden zunächst bezüglich ihres Proteingehaltes, ihres Gesamtgehaltes an CYP 450 und ihres Gehaltes an Cytochrom b_5 charakterisiert. Bei allen Experimenten mit Mikrosomen wurde die jeweils eingesetzte Mikrosomenmenge auf den Proteingehalt der einzelnen Suspensionen standardisiert um mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. In zahlreichen früheren Arbeiten, die den Metabolismus von PAK in humanen Lebermikrosomen betreffen wurde diese Art der Normierung gewählt (Day et al., 1992; Köhl et al., 1996 1),2); Staretz et al., 1996).
Der CYP 450-Gesamtgehalt erfaßt die Summe aller Isoenzyme der CYP 450-Superfamilie.

4.1.3.1 Tierische Mikrosomen

Charakteristische Daten, die für die tierischen Mikrosomen ermittelt wurden, sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben .

Tab. 4.2 Charakterisierung tierischer Mikrosomen

Spezies	Probe	Proteingehalt [mg/ml Suspension]	CYP 450 [nmol/mg Protein]	Cytochrom b_5 [nmol/mg Protein]
Ratte		22	0,86	0,55
Ratte; induziert (Aroclor)		27	1,6	n.b.
Ratte; induziet (Phenobarbital)		22	3,2	n.b.
Schwein	SI SII SIII	10 12 31	0,54 0,46 0,88	n.b. 0,87 0,81
Rind		24	0,87	0,81

Erwartungsgemäß weisen induzierte Rattenlebermikrosomen die höchsten CYP 450-Gehalte auf. In Lebermikrosomen von Schwein, Rind und Ratte wurden um den Faktor 2-3 niedrigere CYP 450-Gehalte gefunden.

4.1.3.2 Humane Lebermikrosomen

Charakteristische Daten der verwendeten Humanlebermikrosomen sind in Tabelle 4.3 wiedergegeben.

Tab. 4.3 Charakterisierung von Protein-, CYP 450 und Cytochrom b_5-Gehalt humaner Lebermikrosomen aus Spenderorganen

Probe	Proteingehalt [mg/ml Suspension]	CYP 450-Gehalt	Cytochrom b_5
39	20.5	0,61	0,718
98	15.7	0,39	0,543
100	6,4	0,45	0,53
107	16,8	0,59	n.d.
108	14,1	0,54	0,60
109	10,0	0,59	0,95
110	20,0	0,96	0,57
112	16,9	0,73	0,76
115	21,6	1,31	0,65
116	19,3	0,48	0,68
118	15,6	0,21	0,35
123	10,1	0,57	0,53
126	9,0	0,53	0,68
129	18,6	0,45	0,68
130	8,2	0,54	0,56
132	13,5	0,77	0,64
133	9,1	0,77	0,69
134	10,6	0,72	0,69
Mittelwert		$0,62 \pm 0,24$	$0,64 \pm 0,12$

Aus den Daten ist zu erkennen, daß die Gesamt-CYP 450-Gehalte zwischen einzelnen humanen Leberpräparationen um etwa den Faktor 3 variieren (Guengerich et al., 1995 2)).

4.1.4 Metabolismus von B[*c*]PH

Der B[*c*]PH-Metabolismus wurde zunächst in einer Reihe tierischer Lebermikrosomen bestimmt und dem Metabolismus in humanen Leber- und Lungenmikrosomen gegenübergestellt, um Speziesunterschiede im Metabolitenspektrum zu ermitteln.

4.1.4.1 Metabolismus von B[*c*]PH in tierischen Lebermikrosomen

Die einzelnen Metabolitenbildungsraten der tierischen Mikrosomen sind in Tabelle 4.5 zusammengefaßt.

Inkubationsbedingungen für alle verwendeten Mikrosomen:
^{3}H-B[*c*]PH: 5µM
Mikrosomen: 0,5 mg/ml

4.1.4.1.1 B[*c*]PH-Metabolismus in Schweinelebermikrosomen

Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen liefern B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetaboliten und B[*c*]Ph-3,4-DH als Nebenmetaboliten. Phenolische Metabolite sowie polarere Metabolite als Dihydrodiole wurden nicht detektiert (Abb.4.3).

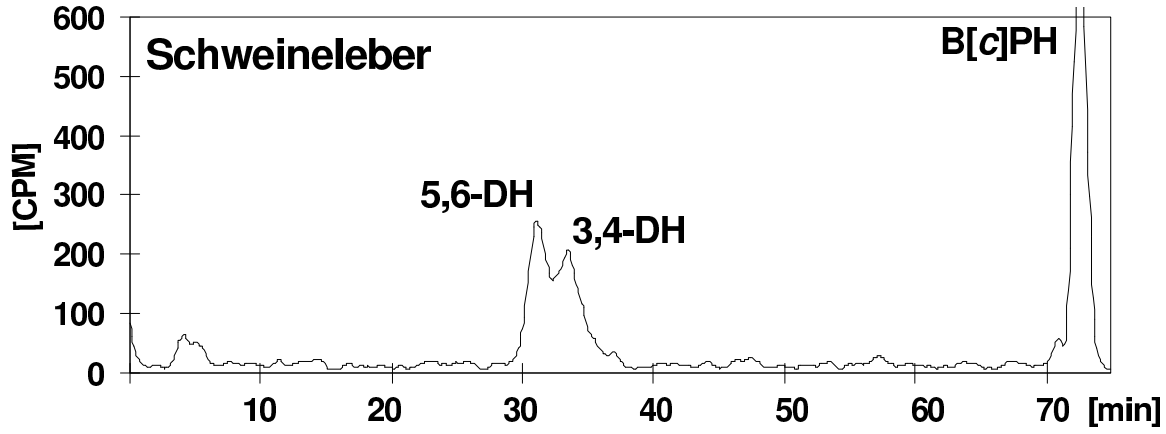


Abb.4.3 Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH: Typisches Radiochromatogramm; HPLC-Bedingungen: RP 18-Säule; Methanol 40-100%/Wasser-Gradient

4.1.4.1.2 Zeitabhängigkeit der B[*c*]PH-Metabolitenbildung in Schweinelebermikrosomen

Zum Vergleich der B[*c*]PH-Metabolitenbildung in den einzelnen Mikrosomenproben sind Inkubationsbedingungen zu wählen, bei denen die Metabolitenbildung linear

abhängig von der Inkubationszeit ansteigt, um eine Umrechnung der Metabolitenbildung pro Minute zu gewährleisten. Weiterhin sollte für Nachweis und Quantifizierung der Metaboliten die gebildete Metabolitenmenge möglichst groß sein.
Die B[*c*]PH-Metabolitenbildung nach Inkubation mit Schweinelebermikrosomen wurde daher nach verschiedenen Inkubationszeiten untersucht. Sie wies über 20 min hinaus einen linearen Verlauf auf (Abb. 4.4). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde deshalb eine Standardinkubationszeit von 20 min gewählt. Eine Inkubationszeit von 20 min wurde bereits in früheren PAK-Metabolismusstudien mit Lebermikrosomen verwendet (Köhl et al., 1996 1),2); Staretz et al,1996).

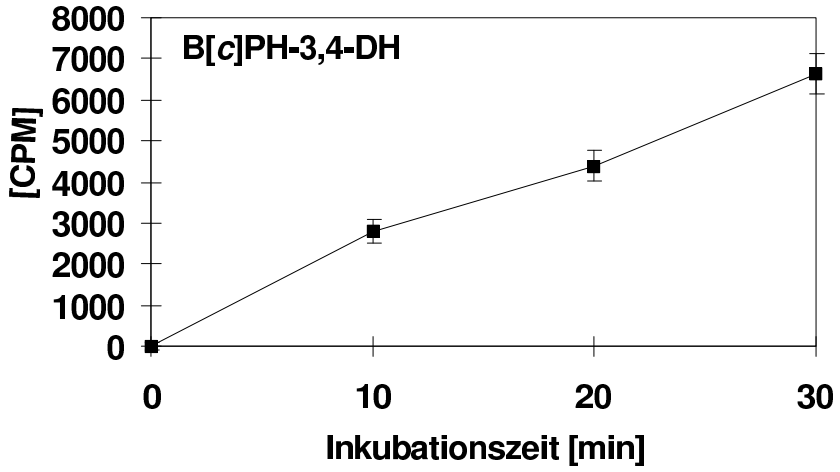


Abb. 4.4 Abhängigkeit der B[*c*]PH-3,4-DH-Bildung in Schweinelebermikrosomen von der Inkubationszeit

4.1.4.1.3 B[*c*]PH-Metabolismus in Rinderlebermikrosomen

Mikrosomen aus Rinderleber bilden bei Inkubation von B[*c*]PH die Metaboliten B[*c*]PH-3,4-DH und B[*c*]PH-5,6-DH zu etwa gleichen Anteilen. Auch hier sind phenolische Verbindungen nicht nachweisbar (Abb. 4.5).

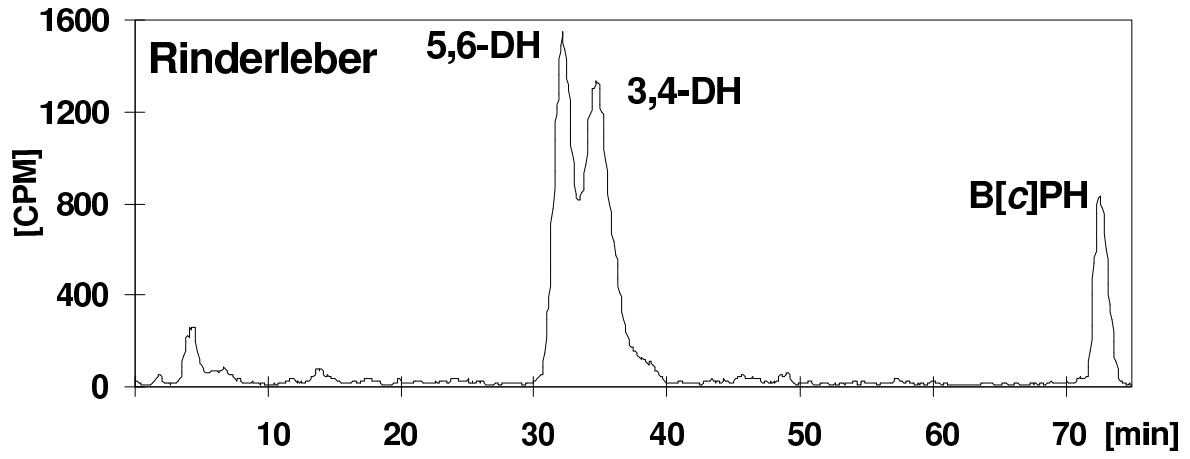


Abb.4.5 Inkubation von Rinderlebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH: Radiochromatogramm

4.1.4.1.4 B[*c*]PH-Metabolismus in Rattenlebermikrosomen

Es wurden sowohl nicht-induzierte, aroclorinduzierte als auch phenobarbital-induzierte Rattenlebermikrosomen mit B[*c*]PH inkubiert (Abb.4.6 u.4.8). Die einzelnen Metabolitenbildungsraten sind in Tabelle 4.5 gegenübergestellt. Phenobarbital- und aroclorinduzierte Rattenlebermikrosomen wiesen wie erwartet eine deutlich höhere Aktivität als Lebermikrosomen nicht-induzierter Ratten auf.

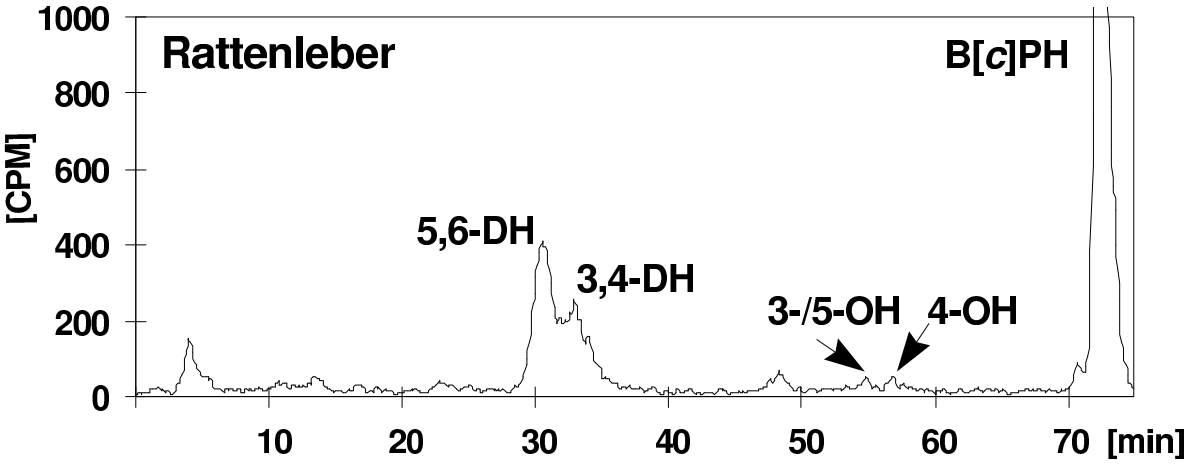


Abb. 4.6 Radiochromatogramm einer Inkubation von nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH

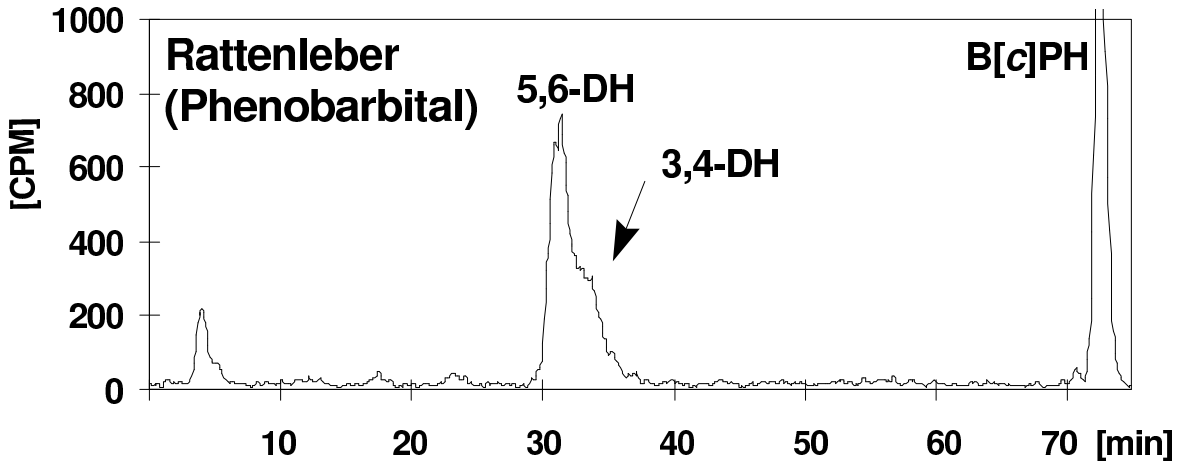


Abb.4.7 Radiochromatogramm einer Inkubation von phenobarbitalinduzierten Rattenlebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH

Phenobarbitalinduzierte (Abb.4.7) und nicht-induzierte (Abb. 4.6) Rattenlebermikrosomen bildeten B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetaboliten. B[*c*]PH-3,4-DH-Bildung in nennenswertem Ausmaß wurde lediglich in nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen beobachtet. Geringe Mengen 4-OH B[*c*]PH, 3- oder 5-OH B[*c*]PH wurden ebenfalls von nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen generiert (Abb. 4.6). Die prozentuale Metabolitenbildung in nicht-induzierten und phenobarbitalinduzierten Rattenlebermikrosomen ist vergleichend den in der Literatur beschriebenen Daten in Tabelle 4.4 gegenübergestellt.

Tab. 4.4 B[*c*]PH-Metabolitbildung in Rattenlebermikrosomen: Vergleich mit der Studie von Ittah et al., 1983

Metabolitbildung [% bezogen auf ∑ Dihydrodiole und Phenole]						
Spezies	**B[*c*]PH-3,4-DH**		**B[*c*]PH-5,6-DH**		**∑3-, 4-, 5-OH-B[*c*]PH**	
	eigene Daten	*Ittah et al, 1983*	eigene Daten	*Ittah et al, 1983*	eigene Daten	*Ittah et al., 1983*
Ratte	35	16,8	57	76,6	7	6,5
Ratte, induziert (Phenobarbital)	*n.q.*	5,5	>95%	88,3	*n.d.*	5,5

n.d: nicht detektiert
n.q.: nicht quantifiziert

Die Daten korrelieren mit den von Ittah et. al. (1983) beschriebenen Inkubationsexperimenten in Bezug auf Metabolitenmuster und Metabolitenbildungsraten und bestätigen die Eignung der in dieser Arbeit entwickelten Methodik (Tab. 4.4). Sie zeigen, daß in der Ratte unabhängig von der Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital solche Metabolite bevorzugt gebildet werden, die *in vitro* und *in vivo* wenig biologische Aktivität besitzen.

Erstmals wurde der Metabolismus von B[*c*]PH in aroclorinduzierten Rattenlebermikrosomen untersucht. Neben B[*c*]PH-5,6-DH wurde ein weiterer polarer Hauptmetabolit generiert, der nicht identifiziert werden konnte. B[*c*]PH-3,4-DH konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Wie aus Tab. 4.5 zu ersehen ist, wurde unter den gewählten Bedingungen B[*c*]PH weitgehend umgesetzt und bereits gebildetes B[*c*]PH-3,4-DH möglicherweise weiter metabolisiert zu polareren Metaboliten. Dies steht in Einklang mit dem ausgeprägten Auftreten einer Reihe polarer Metabolite und einer erhöhten ^{3}H-Restaktivität im Inkubationsansatz nach Extraktion der in Ethylacetat löslichen Metabolite im Vergleich zu denen phenobarbitalinduzierter und nicht-induzierter Rattenlebermikrosomen, was auf verstärkte Bildung wasserlöslicher Folgeprodukte hindeutet. Die geringe Phenolbildung in allen Rattenleberpräparationen deutet auf eine starke Hydrolaseaktivität hin. Epoxidhydrolasen sind für die Dihydrodiolbildung essentiell.

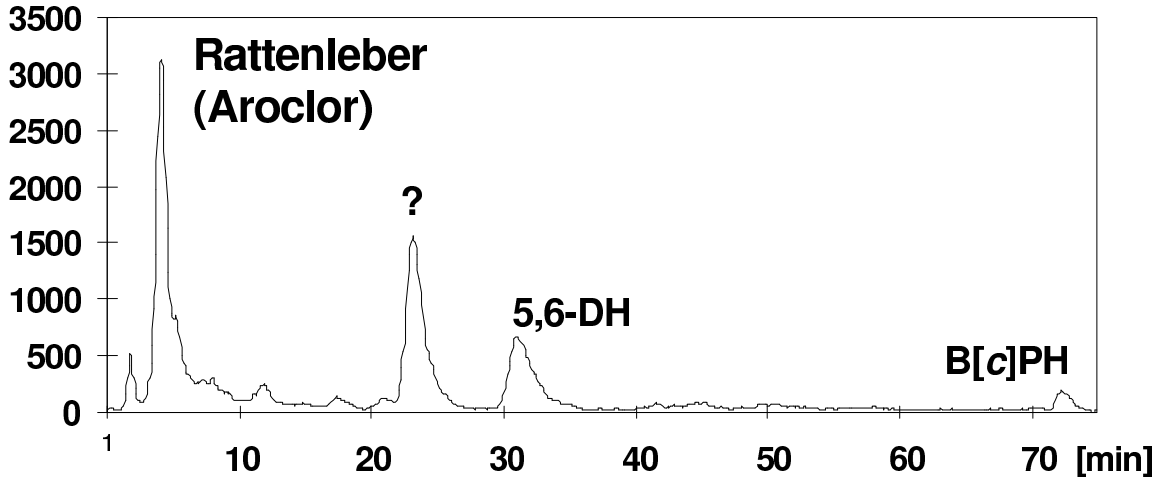


Abb.4.8 Radiochromatogramm einer Inkubation von aroclorinduzierten Rattenlebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH

Tab. 4.5 Bildungsraten von B[*c*]PH-Metaboliten in tierischen Lebermikrosomen

B[*c*]PH-Metabolite [pmol/mg Protein x min]				
Spezies	**B[*c*]PH-3,4-DH**	**B[*c*]PH-5,6-DH**	**Σ 3- ,4- , 5-OH-B[*c*]PH**	**unmetabolisiertes B[*c*]PH [%]**
Ratte	10,3	16,8	2,1	50±5
Ratte, induziert (Phenobarbital)	*n.q.*	53,6	*n.d.*	33±10
Ratte, induziert (Aroclor)	*n.d.*	35,0	*n.d.*	13±3
Schwein	3,9-9,0	7,6-9,3	*n.d.*	85±5
Rind	84	75	*n.d.*	50±8

n.q.: nicht quantifiziert
n.d.: nicht detektiert

4.1.4.2 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Lebermikrosomen

Ein repräsentatives HPLC-Radiochromatogramm der organisch extrahierbaren Metabolite einer Inkubation von ^{3}H-B[*c*]PH mit Humanlebermikrosomen ist in Abb.4.8 dargestellt.

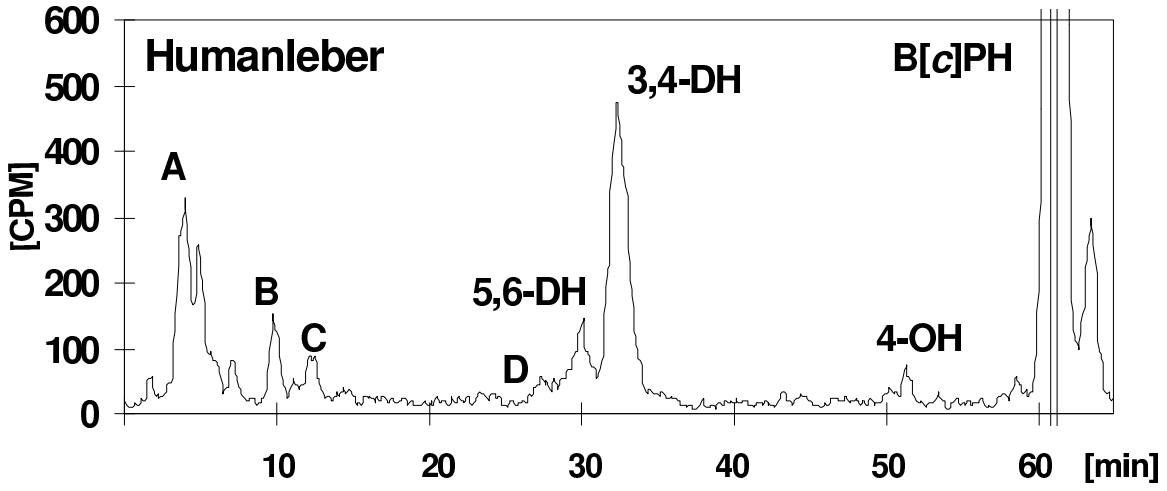


Abb.4.8 Inkubation von Humanlebermikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH: typisches Radiochromatogramm

Wie aus Tabelle 4.6 zu ersehen ist, stellt B[*c*]PH ein gutes Substrat für Humanlebermikrosomen dar.

Tabelle 4.6 B[*c*]PH-Metabolitenbildung in humanen Lebermikrosomen

	Metabolitenbildung [pmol/mg Protein x min][1)]						
Probe	**B[*c*]PH-3,4-DH**	**B[*c*]PH-5,6-DH**	**4-OH-B[*c*]PH**	**A**[2)]	**B**[2)]	**C**[2)]	**D**[2)]
39	11,3	5,8	n.d.	7,6	1,6	n.d.	n.d.
98	21,7	4,5	n.d.	8,4	1,6	2,3	n.d.
100	2,5	1,4	n.d.	2,7	n.d.	n.d.	n.d.
107	26,8	6,2	0,7	21,0	3,8	2,2	n.d.
108	21,5	3,9	0,8	14,4	2,2	3,1	n.d.
109	20,1	5,1	1,2	15,7	3,0	2,5	n.d.
110	10,3	5,8	n.d.	11,2	n.d.	n.d.	n.d.
112	25,4	5,4	1,7	14,7	4,6	2,6	1,8
115	22,0	11,3	1,5	18,6	2,5	n.d.	7,5
116	13,1	5,3	0,7	13,9	2,4	2,0	4,3
118	3,7	1,5	n.d.	1,7	n.d.	n.d.	n.d.
123	6,6	1,7	0,7	7,5	3,9	n.d.	n.d.
126	10,6	1,0	0,7	6,4	1,4	1,7	n.d.
129	17,6	5,1	1,3	10,4	2,0	3,2	4,5
130	4,1	1,8	n.d.	3,2	1,2	n.d.	n.d.
132	16,4	5,1	0,5	10,8	1,9	3,5	4,1
133	18,6	5,4	0,9	17,5	4,4	n.d.	1,6
134	12,4	6,1	0,6	6,4	1,4	2,2	3,9
Mittelwert	**14,7**	**4,6**	**1,0**	**10,7**	**2,1**	**1,4**	**1,5**
Bereich	**2,5-26,8**	**1,0-11,3**	**0,5-1,7**	**2,7-21,0**	**1,2-4,6**	**1,7-3,5**	**1,6-7,5**

1) Die Abweichungen innerhalb einer Doppelbestimmung betragen durchschnittlich 10%. Die Metabolitenbildungsraten wurden durch Bezug auf die Aktivität von unmetabolisiertem ^{3}H B[*c*]PH berechnet.
2) A,B,C,D: polare, nicht spezifizierte Metabolite

Qualitativ vergleichbare Metabolitenprofile wurden mit allen 18 Humanleberproben erhalten. In allen Proben wurde B[*c*]PH-3,4-DH als Hauptmetabolit generiert (2,5-26,8 pmol/mg Protein min), B[*c*]PH-5,6-DH als Nebenmetabolit (1,0-11,3 pmol/mg

Protein min). 4-OH B[*c*]PH wurde in geringen Mengen in neun Proben generiert. Zusätzlich wurden vier Signale in den Chromatogrammen beobachtet, deren Retentionszeiten kürzer sind als die der Dihydrodiole und auf die Bildung polarer Folgeprodukte wie B[*c*]PH-Triole und Tetraole hindeuten. Der am meisten ausgeprägte Metabolit „A“ wurde in allen 18 Proben beobachtet. Die Metaboliten „B“, „C“ und „D“ wurden in den meisten der 18 Proben detektiert.

Die gebildeten Mengen der Metaboliten variierten 2 bis 10-fach, sind jedoch größtenteils gut miteinander korreliert (Tab. 4.7), was als Hinweis auf die unter 4.1.4.4 beschriebene Beteiligung, spezifischer Isoenzyme an der Aktivierung von B[*c*]PH gewertet werden kann.

Tab.4.7 Korrelationskoeffizienten zwischen B[*c*]PH-Metaboliten in humanen Lebermikrosomen

	B[*c*]PH -5,6-DH	**4-OH B[*c*]PH**	**A**	**B**	**C**	**D**
B[*c*]PH-3,4-DH	**0,5568** [a)]	**0,6853** [b)]	**0,8473**[c)]	**0,7125**[a)]	**0,5648**[b)]	0,3510
B[*c*]PH-5,6-DH	-	0,3451	**0,6653** [b)]	0,3240	0,0503	**0,4888** [a)]
4-OH B[*c*]PH	-	-	**0,6822** [a)]	**0,7963**[c)]	0,4130	**0,5129**[b)]
A	-	-	-	**0,7559**[a)]	0,2980	0,3486
B	-	-	-	-	0,2943	0,3211
C	-	-	-	-	-	0,3255

Fettdruck: signifikante Korrelation
a) $p<0,05$
b) $p<0,01$
c) $p<0,001$

Korrelationen bestehen zwischen beiden gebildeten Dihydrodiolen und wie erwartet zwischen 4-OH B[*c*]PH und B[*c*]PH-3,4-DH, die beide aus der gleichen Epoxidvorstufe gebildet werden können. Korrelationen bestehen weiterhin zwischen B[*c*]PH-3,4-DH und den polaren Metaboliten A-C, die wahrscheinlich Folgeoxidationsprodukte der Dihydrodiole darstellen. Diese Argumentation wird auch durch die verkürzte Retentionszeit unterstützt.

Die Daten zeigen weiterhin klare Beziehungen zwischen 4-OH B[*c*]PH und den Metaboliten A sowie B.

Proben mit den höchsten (HL 115) und niedrigsten (HL 118) Gesamt-CYP 450-Gehalten weisen auch die höchsten bzw. niedrigsten Metabolitenbildungsraten auf, wenngleich in den meisten Fällen kein Bezug zwischen Metabolitenbildung und Gesamt-CYP 450-Gehalt hergestellt werden konnte.

Ähnliche Variationen im humanen PAK-Metabolismus wurden auch für 5-Methylchrysen (5-MeCHR) von Köhl et al., (1996) und B[*a*]P von Staretz et al., (1996) unter Verwendung des gleichen Mikrosomensatzes beschrieben. Die Bildungsraten für die jeweiligen Prokanzerogene 5-MeCHR-1,2-DH und B[*a*]P-7,8-DH sind in Tabelle 4.8 den in dieser Studie für B[*c*]PH ermittelten Daten gegenübergestellt.

Tab. 4.8 Vergleich der Prokanzerogenbildung in humanen Lebermikrosomen aus den Substraten B[*a*]P (Staretz et al., 1996), 5-MeCHR (Köhl et al., 1996 1)) und B[*c*]PH

	PAK		
	B[*a*]P	**5-MeCHR**	**B[*c*]PH**
	prokanzerogenes Dihydrodiol		
	B[*a*]P-7,8-DH	**5-MeCHR-1,2-DH**	**B[*c*]PH-3,4-DH**
humane Lebermikrosomen	**Bildungsrate [pmol/mg protein/min]**		
39	1,0	2,31	11,3
98	0,39	1,85	21,7
100	*n.b*	0,26	2,5
107	2,0	2,27	26,8
108	1,9	1,38	21,5
109	1,8	1,84	20,1
110	0,74	1,00	10,3
112	*n.b*	1,88	25,4
115	0,48	1,05	22,0
116	0,52	1,26	13,1
118	*n.b*	0,24	3,7
123	*n.b*	0,68	6,6
126	*n.b*	1,15	10,6
129	0,74	1,16	17,6
130	*n.b*	0,58	4,1
132	0,94	1,24	16,5
133	*n.b*	1,46	18,6
134	*n.b.*	1,07	12,4
Mittelwert	**1,1 ± 0,6**	**1,3 ± 0,6**	**14,7 ± 7,5**
Bereich	**0,39-2,0**	**0,26-2,31**	**2,5-26,8**

Die Bildung des B[*c*]PH-3,4-DH korreliert gut (r=0,7482; p=0,002) mit der Bildung von 5-Methylchrysen-1,2-DH aus 5-Methylchrysen (Köhl et al., 1996 1)) in den gleichen Proben (Tab. 4.8).
Wie aus den Daten weiterhin zu ersehen ist, sind die Bildungsraten für B[*c*]PH-3,4-DH um den Faktor 10 größer als jene für B[*a*]P-7,8-DH aus B[*a*]P und 5- bis 20- fach stärker als für 5-MeCHR-1,2-DH aus 5-MeCHR, während die Summe aller gebildeten B[*c*]PH Metabolite nur um Faktor 2-5 größer zu sein scheint als die Summe der Metabolite aus 5-MeCHR und B[*a*]P (Köhl et al., 1996 1); Staretz et al., 1996).
Weitere Studien beschreiben interindividuelle Variabilität beim Metabolismus von B[*a*]P, 6-Methylchrysen und Chrysen nach Aktivierung mit Humanlebermikrosomen (Harris et al., 1976; Köhl et al., 1996 1); Köhl et al., 1996 2); Shimada et al., 1989; Yun et al., 1992).

4.1.4.3 Speziesabhängigkeit des B[*c*]PH-Metabolismus

Alle getesteten humanen und tierischen Mikrosomen generieren B[*c*]PH-Dihydrodiole, wobei sowohl die Bildung von B[*c*]PH-5,6-DH als auch von B[*c*]PH-3,4-DH beobachtet wird. Hydroxy-B[*c*]PH-Bildung wurde in Humanlebermikrosomen und uninduzierten Rattenlebermikrosomen nachgewiesen.
B[*c*]PH hat sich als ein schwaches Kanzerogen im Nager gezeigt. Hierfür wird die geringe Bildungsrate des Prokanzerogens B[*c*]PH-3,4-DH verantwortlich gemacht (Ittah et al., 1983, Einolf et al., 1996). Auch Schweinelebermikrosomen generieren dieses Metabolitenmuster, wärend Rinderlebermikrosomen B[*c*]PH-5,6-DH und B[*c*]PH-3,4-DH zu ungefähr gleichen Anteilen bilden.
Im Gegensatz dazu steht die bevorzugte Bildung von B[*c*]PH-3,4-DH in humanen Lebermikrosomen als Vorläufer der kanzerogenen B[*c*]PH-3,4-DH-Epoxide. Hieraus läßt sich ableiten, daß die Bildung biologisch aktiver B[*c*]PH-Metabolite in der menschlichen Leber begünstigt ist, während in der Rattenleber bevorzugt wenig biologisch aktive Metaboliten gebildet werden. Die ermittelten *in vitro*-Daten korrelieren zudem gut mit Metabolismusstudien in humanen MCF-7-Mammacarcinomzellen, die B[*c*]PH zu DNA-bindenden B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxiden aktivieren (Einolf et al., 1996).

4.1.4.4 Beteiligung von humanen CYP 450-Isoenzymen an der Aktivierung von B[*c*]PH

Zur Identifizierung der an der B[*c*]PH-Aktivierung beteiligten Isoenzyme wurden 3 unabhängige Verfahren angewendet:

1) Korrelation der gebildeten Metabolitenmengen mit CYP 450-Isoenzym-spezifischen Markeraktivitäten der Mikrosomen (Korrelationsstudien)
2) Inkubation der Mikrosomen mit CYP 450-Isoenzym-spezifischen Inhibitoren
3) Inkubation von rekombinanten humanen CYP 450-Isoenzymen

4.1.4.4.1 Korrelationsstudien

Zur Durchführung der Korrelationsstudien wurden zunächst einzelne isoenzymspezifische Aktivitäten in den Humanlebermikrosomen bestimmt, die das CYP 450-Spektrum in der Humanleber charakterisieren (vgl. 2.6).

4.1.4.4.1.1 Charakterisierung der CYP 450-Isoenzymaktivitäten der Mikrosomen

Charakteristische Daten zum CYP 450-Isoenzymmusters der Lebermikrosomen lagen bereits vor (Guengerich et al., 1995 2)). Die getesteten Markerenzymaktivitäten sowie die korrespondierenden Isoenzyme sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

4.1.4.4.1.1.1 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) Aktivität

Die Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)-Aktivität ist ein Marker für die CYP 1A1- und 1A2-Aktivität von Mikrosomen. Die gemessenen EROD-Aktivitäten der einzelnen Mikrosomenpräparationen wurden erstmals von Guengerich et al., (1995 2)) bestimmt. Da das Mikrosomenmaterial 24 Monate bei -72°C im Biofreezer gelagert wurde, sollte auf eine mögliche Abnahme der Isoenzymaktivitäten während der Lagerzeit geprüft werden. Die EROD-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch untersucht.
Die von Guengerich et al. (1995 2)) und im Rahmen dieser Arbeit gemessenen EROD-Aktivitäten sind in Tabelle 4.12 vergleichend gegenübergestellt.

Insgesamt ergab sich eine deutliche Abnahme der Aktivitäten während der Lagerzeit. Es wurden noch maximal 60 % der anfänglichen EROD-Aktivität gemessen. Jedoch korrelierten die beiden Datenreihen zur EROD-Aktivität sehr gut (r=0,9051 p= 0,0002). Die Metabolitenmengen wurden jeweils mit beiden Datenreihen korreliert, wobei die ermittelten Koeffizienten nur unbedeutend voneinander abwichen. Von Friedel (1997) konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die Nifedipinoxidase-Aktivitäten der Mikrosomen während der Lagerung weitgehend konstant geblieben sind (Tab. 4.12).

Tab. 4.12 Lagerungsbedingte Veränderungen einzelner Isoenzymaktivitäten in humanen Lebermikrosomen; n.b.: nicht bestimmt

	EROD [pmol/mg Protein x min] (CYP 1A2)		**NF [nmol/mg protein x min] (CYP 3A4)**	
Probe	(Guengerich et al., 1995 2))	**eigene Daten**	(Guengerich et al., 1995)	Friedel, 1997
39	99	**42**	3,4	n.b.
98	60	**23**	2,1	n.b.
100	28	**14**	1,4	n.b.
107	284	**108**	3,5	n.b.
108	306	**129**	1,2	1,2
109	248	**101**	2,0	n.b.
110	91	**53**	15,4	11,1
112	280	**88**	1,9	n.b.
115	252	**70**	23,1	n.b.
116	108	**40**	2,4	n.b.
118	17	**10**	0,5	n.b.
123	84	**29**	1,5	n.b.
126	85	**22**	1,6	n.b.
129	87	**45**	0,7	n.b.
130	37	**20**	0,7	n.b.
132	189	**79**	0,1	n.b.
133	391	**83**	4,3	n.b.
134	79	**48**	5,1	n.b.

Die Daten decken sich mit Studien von Yamazaki et al., (1996), der nach fünfjähriger Lagerung eine Abnahme der EROD-Aktivität um 50% beschreibt, während für die Nifedipinoxidase-Aktivität sowie die übrigen in Tab. 4.13 aufgeführten Markeraktivitäten nur eine 5-25 %ige Abnahme festgestellt werden konnte. Daher wurden -mit

Ausnahme der EROD-Aktivitäten- die von Guengerich et al. (1995 2)) ermittelten Daten zugrunde gelegt.

4.1.4.4.1.1.2 CYP 450-Isoenzym-spezifische Aktivitäten der humanen Lebermikrosomen

Die CYP 450-spezifischen Markeraktivitäten der verwendeten Mikrosomenproben sind in Tab. 4.13 aufgelistet.

Tab. 4.13 Übersicht über die Isoenzym-spezifischen Markeraktivitäten der humanen Lebermikrosomen

	CYP 450-spezifische Aktivität					
	pmol/mg Protein x min			nmol/mg Protein x min		
Probe	**EROD 1A2**	**BUF[1)] 2D6**	**MP[1)] 2C19**	**NF[1)] 3A4**	**CZ[1)] 2E1**	**COUM[1)] 2A6**
39	42	597	25	3,4	6,42	0,60
98	23	300	11	2,1	2,86	0,81
100	14	561	21	1,4	5,69	0,72
107	108	435	152	3,5	2,99	0,47
108	129	60	30	1,2	2,31	1,12
109	101	135	25	2,0	3,56	1,01
110	53	260	56	15,4	1,76	0,55
112	88	313	92	1,9	3,65	0,33
115	70	239	273	23,1	5,34	n.d.
116	40	620	96	2,4	2,86	0,58
118	10	131	49	0,5	0,89	0,16
123	29	172	39	1,5	2,06	0,24
126	22	337	207	1,6	1,17	0,63
129	45	55	8	0,7	2,3	0,39
130	20	247	11	0,7	3,97	0,36
132	79	719	36	0,1	7,22	0,37
133	83	333	215	4,3	6,82	2,21
134	48	813	38	5,1	3,42	1,50
Bereich	**10-129**	**55-813**	**8-273**	**0,1-23,1**	**0,89-7,22**	**0,16-2,21**

EROD Ethoxyresorufin-O-deethylierung
NF: Nifedipinoxidase
MP: (S)-Mephenytoin-4´-hydroxylierung
BUF: Bufuralol-1´-hydroxylierung
CZ: Chlorzoxazon-6-hydroxylierung
COUM: Coumarin-7-hydroxylierung
1) Guengerich et al., 1995

Das Spektrum an gemessenen CYP 450-isoenzymspezifischen Aktivitäten erfaßt alle wesentlichen in der menschlichen Leber vorhandenen CYP 450-Isoenzyme. CYP 450-Hauptenzyme in der menschlichen Leber, die gleichzeitig besondere Bedeutung für den Fremdstoffmetabolismus besitzen sind CYP 3A4 (ca. 40%) und CYP 1A2 (ca. 18%). Enzyme der 2C-Unterfamilie bilden einen Anteil von ca 25%, während die Anteile von CYP 2E1, CYP 2A6, CYP 2D6 und CYP 2B6 unter 10% liegen. CYP 3A4 ist auch in der Darmwand in wesentlichen Anteilen vorhanden und dort für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlich (Waller et al., 1984).
Die einzelnen Isoenzymaktivitäten stellen ein relatives Maß für den Gehalt der einzelnen Isoenzyme dar und dienem dem Vergleich der Proben untereinander (Guengerich, 1995 1)).
Die Markeraktivitäten der Proben unterscheiden sich in der Regel bis zu einem Faktor von 10 bis 20, für die Nifedipinoxidase-Aktivität bis zu einem Faktor von 200, (Tab. 4.13) während der CYP 450-Gesamtgehalt zwischen den Proben nur um den Faktor 2-3 variiert.
Die hohe Variabilität der Isoenzymaktivitäten und die hohe Anzahl der Mikrosomenproben bilden die Grundlage für die Aussagekraft der Korrelationsstudien.

4.1.4.4.1.3 Korrelationen zwischen CYP 450-Isoenzym-spezifischen Markeraktivitäten und B[*c*]PH-Metaboliten

Durch Korrelation der in Tab. 4.13 aufgelisteten CYP 450-spezifischen Markeraktivitäten mit den gebildeten Metabolitenmengen in denselben Proben (Tab. 4.6) sollen die maßgeblich an der B[*c*]PH-Aktivierung beteiligten Isoenzyme identifiziert werden. Als Auswerteverfahren wurden Spearman-Korrelationen gewählt, ein Verfahren, das für vergleichbare Studien bereits in früheren Arbeiten benutzt wurde (Köhl et al., 1996 1); 2); Staretz et al., 1996). Bei der Spearman- Korrelation wird die Rangfolge von Wertepaaren zweier Reihen verglichen. Im Gegensatz zur linearen Regression erfordert die Spearman-Korrelation keine Elimination von Ausreißern.
Die Ergebnisse der Spearman Korrelationen zwischen den gebildeten Metabolitenmengen und den spezifischen Isoenzymaktivitäten sind in Tabelle 4.14 aufgelistet.

Tabelle 4.14 Korrelationskoeffizienten [*r*] zwischen CYP 450-Isoenzym-Markeraktivitäten und B[*c*]PH-Metabolitbildung

CYP 450-Isoenzym-Markeraktivitäten						
Metabolit	**EROD 1A2**	**MP 2C19**	**BUF 2D6**	**CZ 2E1**	**NF 3A4**	**COUM 2A6**
B[*c*]PH-3,4-DH	**0,7750** [a]	0,2592	-0,0630	0,2117	0,3521	0,2843
B[*c*]PH-5,6-DH	**0,5930** [b]	0,3721	0,2955	0,3421	**0,7519** [a]	0,1730
4-OH B[*c*]PH	**0,6759** [a]	0,3618	-0,3038	0,0857	0,1856	0,1328
A	**0,8700** [c]	0,4667	-0,0630	0,2695	**0,5049** [b]	0,2647
B	**0,6484** [a]	0,3901	-0,1127	0,2225	0,2121	0,0295
C	**0,5054** [b]	-0,2706	-0,0194	-0,0054	-0,3117	0,1016
D	0,2359	0,2478	0,1819	0,2995	0,1550	-0,0201

Fettdruck: signifikante Korrelation
a) $p<0,01$
b) $p<0,05$
c) $p<0,001$

Signifikante Korrelationen (durch stärkere Schrift hervorgehoben) wurden zwischen der EROD (CYP 1A1/1A2)-Aktivität der Lebermikrosomen und B[*c*]PH-3,4-DH, B[*c*]PH-5,6-DH und 4-OH B[*c*]PH gefunden. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen der B[*c*]PH-5,6-Dihydrodiol-Bildung und der CYP 3A4-Aktivität der Mikrosomen festgestellt. Keine Korrelationen wurden mit den 2C19, 2D6, 2E1 und 2A6-Aktivitäten der Mikrosomen festgestellt. Aus den ermittelten Daten läßt sich ableiten, daß CYP 1A2 und in geringerem Ausmaß CYP 3A4 in menschlichen Lebermikrosomen an der Oxidation von B[*c*]PH zu Dihydrodiolen und Phenolen beteiligt sind.

4.1.4.4.2 CYP 450-spezifische Inhibitoren

Zur Bestätigung der Befunde aus den Korrelationsstudien wurde der Einfluß CYP 450-spezifischer Inhibitoren auf den B[*c*]PH-Metabolismus untersucht. Wie unter 4.1.4.4.1.3. beschrieben, wurden Korrelationen zwischen der B[*c*]PH-

Metabolitenbildung mit den Isoenzymen CYP 1A2 und CYP 3A4 der Mikrosomen festgestellt. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde der CYP 1A2-spezifische Inhibitor α-NF, sowie der CYP 3A4-spezifische Inhibitor Troleandomycin (Trol) (Chang et al., 1994) eingesetzt und die Bildung der B[*c*]PH-Metaboliten untersucht. Es wurden solche Humanlebermikrosomenproben ausgewählt und untersucht, die hohe Gehalte an CYP 1A2 aufwiesen, und in ihrem Gehalt an CYP 3A4 stärker variierten.

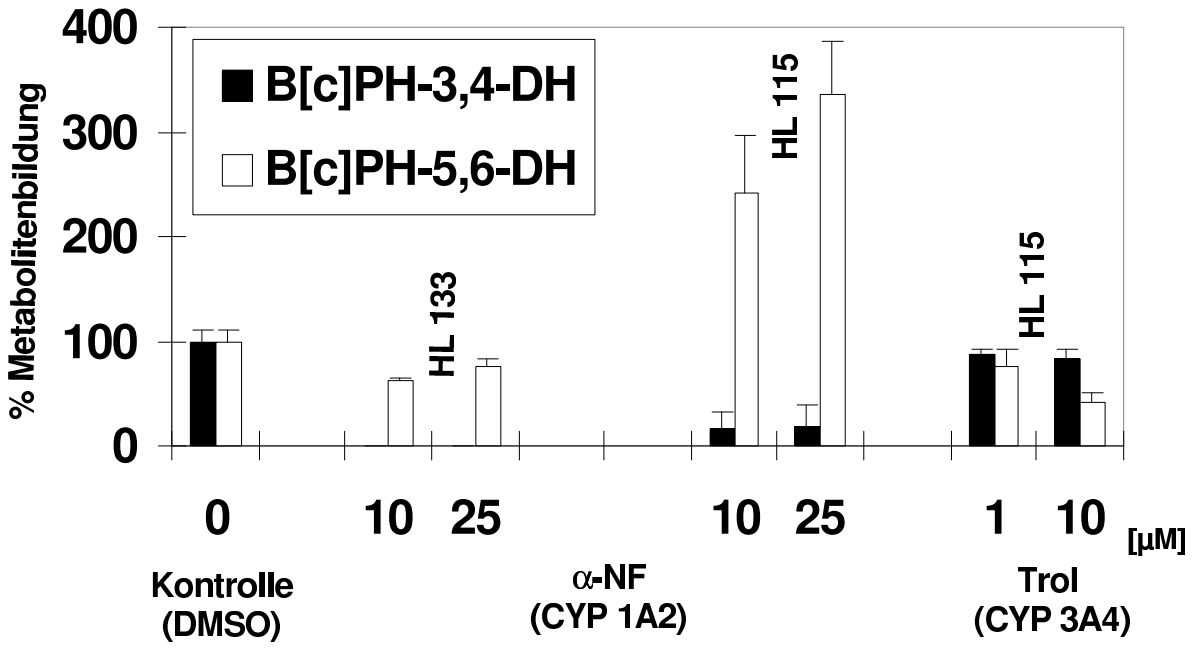


Abb.4.7 Einfluß CYP 450-spezifischer Inhibitoren auf den B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Lebermikrosomen

Die B[*c*]PH-3,4-DH-Bildung in HL 133 wurde bereits bei 10µM α-NF vollständig inhibiert.

HL 133: Humanleberprobe mit niedrigem CYP 3A4-Gehalt

HL 115: Humanleberprobe mit hohem CYP 3A4-Gehalt

Eine dosisabhängige Inhibierung der Bildung des 3,4-Dihydrodiols durch α-NF (10µM α-NF: 70-100% Inhibierung) wurde in allen Proben beobachtet. Die Bildung des 5,6-Dihydrodiols wurde schwach inhibiert in den Proben mit geringen Gehalten an CYP 3A4, während in Proben, die hohe Gehalte an CYP 3A4 aufwiesen, die 5,6-Dihydrodiol-Bildung 2-3,5-fach verstärkt wurde. (10-25µM α-NF) (Abb. 4.7).

Interessanterweise wurden unter diesen Bedingungen Metabolite gebildet, die mit 3- und 5-OH B[*c*]PH koeluieren und auf eine Verschiebung der bevorzugten Hydroxilierungsposition hindeuten (Abb.4.8).

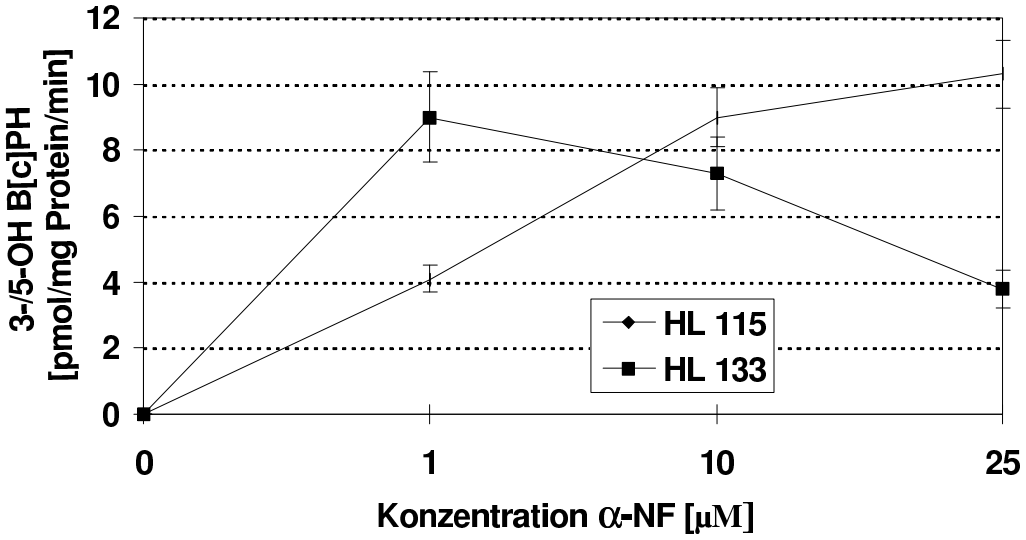


Abb. 4.8 Einfluß von α-NF auf die Bildung von phenolischen B[*c*]PH-Metaboliten in Humanlebermikrosomen

Die 4-OH B[*c*]PH-Bildung wird in allen Proben zusammen mit der 3,4-DH-Bildung inhibiert. In CYP 3A4-reichen Proben (HL 115) steigt die 3-/5-OH B[*c*]PH-Bildung zusammen mit der 5,6-DH-Bildung, während in CYP 3A4 armen Proben (HL 133) die 3-/5-Hydroxylierung bereits ab 1µM abnimmt, in Übereinstimmung mit der leichten Hemmung der 5,6-DH-Bildung in der gleichen Probe. Eine ähnliche Wirkung des Inhibitors α-NF auf das Produktspektrum von PAK wurde auch in früheren Studien festgestellt und beschrieben (Shou et al., 1994).

Bei Inkubationen in Gegenwart des CYP 3A4-Inhibitors Troleandomycin wurde kein Einfluß auf die 3,4-Dihydrodiol-Bildung beobachtet, während die 5,6-Dihydrodiol-Bildung leicht inhibiert wurde (10µM Troleandomycin: 16% Inhibierung). Die Daten belegen die Beteiligung von CYP 1A2 an der Bildung von B[*c*]PH-3,4-DH und geben weitere Hinweise auf die Beteiligung von CYP 3A4 an der Bildung von B[*c*]PH-5,6-DH.

4.1.4.4.3 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen, rekombinanten CYP P450-Enzymen

Ergänzend zu den Untersuchungen mit humanen Gewebepräparationen wurde der B[*c*]PH-Metabolismus mit einzelnen rekombinanten CYP-Isoenzymen untersucht. Im Gegensatz zur Konkurrenzsituation zwischen verschiedenen CYP 450-Isoenzymen in Mikrosomen erlauben rekombinante CYP-Isoenzyme Untersuchungen an individuellen CYP 450-Isoenzymen. Getestet wurden rekombinantes humanes CYP 1A1 und CYP 3A4, das zusammen mit NADPH-Oxidoreduktase in Bakterien exprimiert wurde sowie in Hefen exprimiertes humanes CYP 1B1.

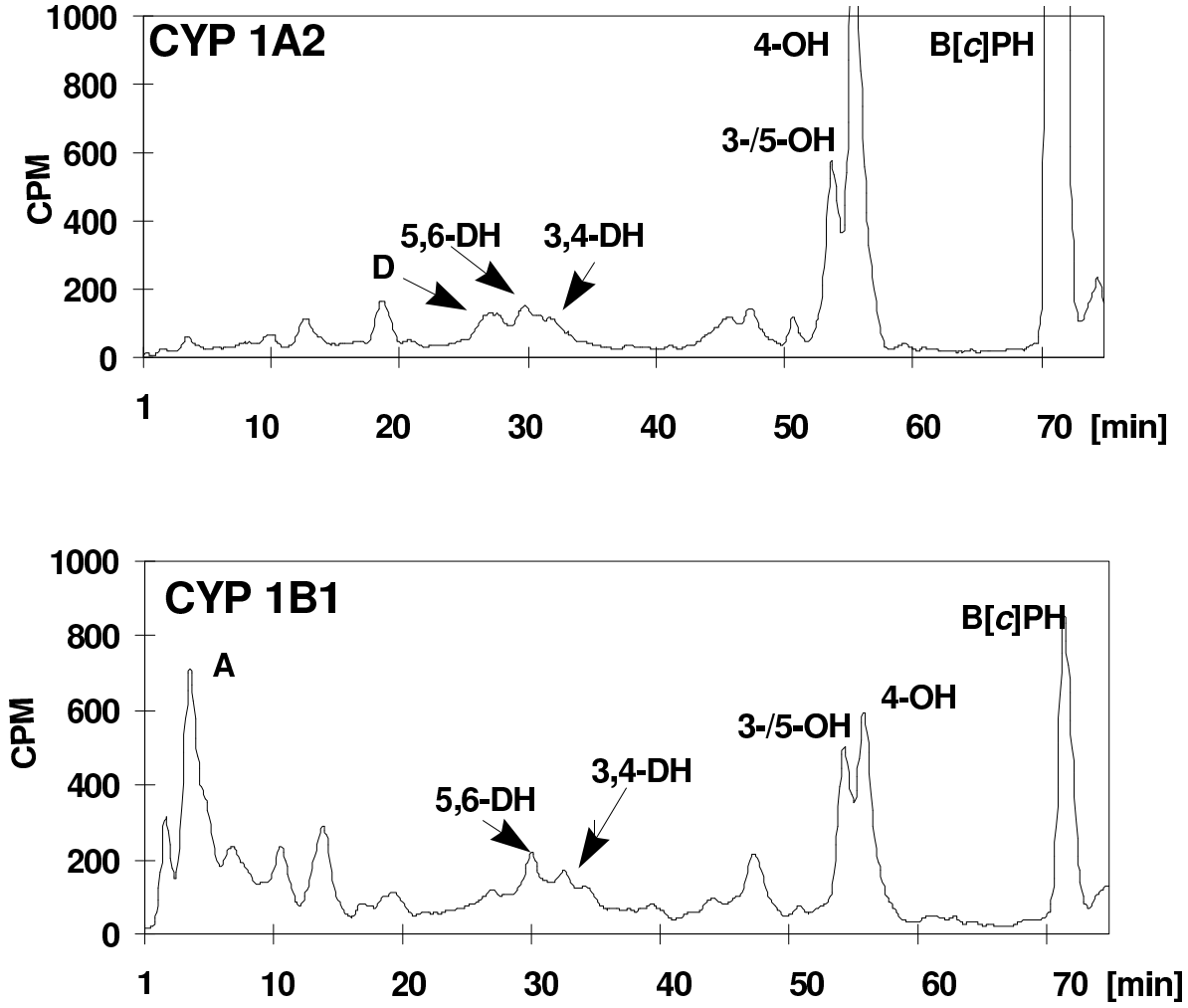


Abb.4.9 B[*c*]PH-Metabolitenbildung in rekombinanten humanen CYP 450-Enzymen
Inkubationsbedingungen: CYP 450: 250 pmol; Substrat 5µM Inkubationszeit: 20 min

Die rekombinanten CYP-Isoenzyme wurden in Form von Membranpräparationen aus den Mikroorganismen ohne den Zusatz von Epoxidhydrolase inkubiert. Die B[*c*]PH-Metabolitenbildung nach Inkubation der rekombinanten CYP-Isoformen ist in Abb.

4.9 dargestellt. Hierbei konnten die in Tab. 4.15 aufgelisteten Metabolitenbildungsraten gemessen werden.

Tab. 4.15 B[*c*]PH-Metabolitenbildung in rekombinanten humanen CYP-Isoenzymen

B[*c*]PH-Metaboliten (pmol/nmol P450/min)[1)]								
rekombinantes CYP 450	**B[*c*]PH-3,4-DH**	**B[*c*]PH-5,6-DH**	**4-OH B[*c*]PH**	**3-OH; 5-OH B[*c*]PH**	**A**	**B**	**C**	**D**
1A2	7,4	8,0	58,8	23,3	3,0	6,6	6,8	9,0
3A4	*n.d.*	*n.d:*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
1B1	6,2	10,4	22,6	19,2	37,6	11,9	1,1	4,5

[1)] ±10%
n.d.: nicht detektiert

Wie bereits bei den Inkubationen mit Mikrosomenpräparationen wurden auch hier Dihydrodiol- und Phenolbildung beobachtet. Die Phenolbildung ist um den Faktor 9 höher als die Dihydrodiolbildung. Die Dihydrodiolbildung erfolgt offenbar spontan in Folge einer geringen Epoxidhydrolaseaktivität (nicht gemessen) der Präparationen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei früheren Studien festgestellt, bei denen B[*c*]PH mit hochgereinigten CYP-Isoenzymen der Ratte in Anwesenheit und Abwesenheit von Epoxidhydrolase inkubiert wurde (Ittah et al., 1983). Diese Daten belegen die Bedeutung der Epoxidhydrolasen für die PAK-Dihydrodiolbildung. Epoxidhydrolasen sind im natürlichen Gewebe in großen Mengen vorhanden.
Rekombinantes CYP 1A2 hydroxyliert B[*c*]PH hauptsächlich in 4-Position. Beide Dihydrodiole wurden in ähnlichem Ausmaß gebildet wie bei den Lebermikrosomen. Weiterhin wurden Metaboliten identifiziert, die mit 3- und 5-OH B[*c*]PH koeluieren. Mit rekombinantem CYP 3A4 konnte unter den gewählten Bedingungen keine Metabolitenbildung beobachtet werden. CYP 1B1 erwies sich dagegen als guter Katalysator für den B[*c*]PH-Metabolismus und generierte ein Metabolitenspektrum vergleichbar mit dem von rekombinantem CYP 1A2.

Vorwiegend wurden 4-OH-B[*c*]PH und weiterhin 3- bzw. 5-OH-B[*c*]PH gebildet (Abb. 4.9). Von den Dihydrodiolen wurden durch CYP 1B1 hauptsächlich das B[*c*]PH-5,6-DH und B[*c*]PH-3,4-DH gebildet. Besonders ausgeprägt war die Bildung eines unbekannten, polaren Metaboliten „A“. Dies korreliert mit dem beobachteten Anstieg der Bildung wasserlöslicher Metabolite, gemessen anhand der Radioaktivität in der Wasserphase (Tab. 4.16). In keinem der Systeme konnte eine B[*c*]PH-Hydroxilierung in Position 1 oder 2 festgestellt werden.

Tab. 4.16 Restaktivität in der Wasserphase nach Extraktion der in Ethylaceteat löslichen Metaboliten

	Kontrolle	**CYP 1A2**	**CYP 3A4**	**CYP 1B1**
Aktivität [CPM] in der wäßrigen Phase	4040±445	7055±178	4391±53	42470±1098

4.1.4.5 Zusammenfassende Betrachtung von Korrelationsstudien, Inhibitorstudien und Inkubation von rekombinanten CYP 450-Isoenzymen

Die Ergebnisse aus Korrelationsstudien und Metabolismusstudien mit CYP-450-Inhibitoren ergeben, daß in der menschlichen Leber vor allem CYP 1A2 und zu geringerem Anteil CYP 3A4 wichtige Katalysatoren für die Oxidation von B[*c*]PH zu den als Hauptmetaboliten auftretenden Dihydrodiolen und Phenolen darstellen. CYP 1A2 ist primär für die Bildung des Prokanzerogens B[*c*]PH-3,4-DH verantwortlich, während CYP 3A4 die Detoxifizierung zum 5,6-DH vermittelt. Rekombinantes CYP 1A2 hydroxyliert B[*c*]PH ebenfalls bevorzugt in Position 4, und weiterführend auch in Position 3 bzw. 5, was in Einklang mit der Dihydrodiolbildung in humanen Lebermikrosomen steht. Bereits frühere Arbeiten beschreiben die Beteiligung spezifischer humaner CYP-Isoenzyme am PAK-Metabolismus (Tab. 4.11).

Tab. 4.11 Beteiligung von CYP 450-Isoenzymen am PAK-Metabolismus

PAK	Metabolit	beteiligtes CYP-Isoenzym	Referenz
Benzo[a]pyren	7,8-DH	1A1/1A2	Roberts-Thomson et al., 1993
		1A2	Staretz et al., 1996
	3-OH	3A4, (1A1)	Roberts-Thomson et al., 1993
		2C8, 3A4	Yun et al., 1992
		3A4, 1A2	Staretz et al., 1996
		1B1	Shimada et al., 1997
	9,10-DH	1A2	Staretz et al., 1996
	4,5-DH	1A2	„
	1-, 9-OH	1A2	„
	Chinone	1A2	„
5-Methylchrysen	1,2-DH	1A1/1A2	Köhl et al., 1996 2)
	5-OH-Methyl	3A4	„
	2-, 7-OH	1A1/1A2, 3A4	„
	1-OH	1A1/1A2	„
6-Methylchrysen	1,2-DH	1A1/1A2	„
	6-OH-Methyl	3A4	„
	1-, 2-, 4-, 7-OH	1A1/1A2	„
Chrysen	5,6-DH	1A1/1A2	Köhl et al, 1996 1)
	1,2-DH	1A1/1A2	„
	1-, 3-, 4-,	1A1/1A2	„
	2-OH; 6-OH	3A4	„

Die B[*c*]PH-3,4-DH-Bildung korreliert mit der von Köhl et al. (1996 1)) nachgewiesenen CYP 1A2-abhängigen Bildung von 5-MeCHR-1,2-DH aus 5-MeCHR im gleichen Mikrosomensatz (r=0,7482 p=0,002). CYP 1B1, für das schon in früheren Studien eine Beteiligung am PAK-Metabolismus nachgewiesen werden konnte, ist ein sehr guter Katalysator für die B[*c*]PH-Aktivierung. Die Ergebnisse korrelieren mit Studien

zum B[*c*]PH-Metabolismus mit Zellkulturen (V79), die menschliche CYP-Isoenzyme exprimieren. Seidel et al. (1998) fanden, daß V79-Zellen, die humanes CYP 1A2 oder CYP 1A1 exprimieren, B[*c*]PH-3,4-DH und B[*c*]PH-5,6-DH generieren. B[*c*]PH-3,4-DH scheint in CYP 1A2 exprimierenden Zellen bevorzugt gebildet zu werden. Dies steht in Einklang mit den Verhältnissen, die in humanen Lebermikrosomen ermittelt wurden. V79-Zellen, die humanes CYP 3A4 exprimieren, bildeten ausschließlich B[*c*]PH-5,6-DH mit niedrigen Bildungsraten. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß CYP 3A4 in der Humanleber ausschließlich für die Bildung des 5,6-Dihydrodiols verantwortlich ist.
CYP 2A6 und CYP 2E1 exprimierende V79-Zellen generierten ebenfalls B[*c*]PH-5,6-DH, während in Humanlebermikrosomen kein Beitrag dieser Isoenzyme nachgewiesen werden konnte. Dies ist möglicherweise auf den im Vergleich zu CYP 3A4 geringeren Gehalt dieser Isoenzyme in der menschlichen Leber zurückzuführen.
Bei Inkubationen mit rekombinantem CYP 1B1 dominiert ein polarer Peak A, und gleichzeitig werden erhöhte Raten an wasserlöslichen Metaboliten generiert. Dies steht in Einklang mit Beobachtungen, daß ausschließlich V79-Zellen, die CYP 1B1 exprimieren, 1,2,3,4-Tetraole als Hydrolyseprodukte der 3,4-Dihydrodiol-1,2-epoxide bilden. Weitere Hinweise zur Beteiligung von CYP 1B1 am B[*c*]PH-Metabolismus in MCF-7 Zellen wurden von Einolf et al., 1997 erhalten. Eine Induktion von CYP 1B1 in MCF-7 Zellen führte zu einer verstärkten B[*c*]PH-DNA-Adduktbildung.

4.1.3.5 B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Lungenmikrosomen

Neben dem Metabolismus von B[*c*]PH in humanem Lebergewebe wurde auch der Metabolismus in humanem Lungengewebe untersucht. Die Lunge stellt ein relevantes Zielgewebe für PAK dar. Die Exposition erfolgt v.a. über Tabakrauch, der zahlreiche PAK, unter anderem B[*c*]PH enthält (Snook et al,1977), und über PAK-haltige Aerosole aus der Umgebungsluft.
Nur eine von insgesamt 11 zur Verfügung stehenden Mikrosomenproben zeigte metabolische Aktivität bei der Inkubation mit B[*c*]PH. Im Gegensatz zu den Lebermikrosomen wurden hauptsächlich B[*c*]PH-5,6-DH (3.0 pmol/mg Protein x min) als Hauptmetabolit, und B[*c*]PH-3,4-DH (1,5 pmol/mg Protein x min) als Nebenmetabolit

gebildet. Auch Spuren eines unbekannten Metaboliten „A“ wurden identifiziert. Darüberhinaus konnten keine weiteren Metaboliten beobachtet werden (Abb.4.10).

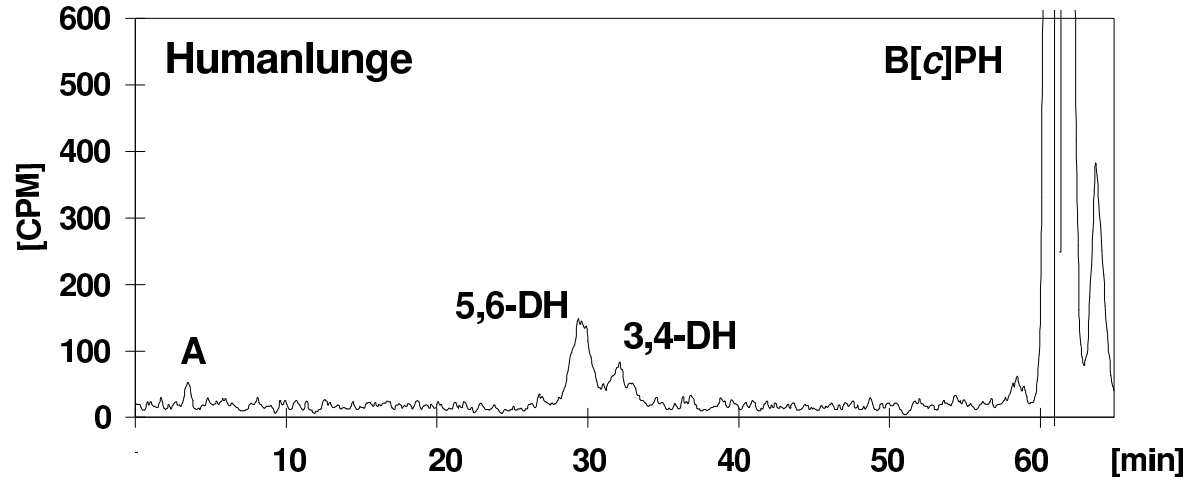


Abb. 4.10 B[*c*]PH-Metabolitenbildung in der aktiven humanen Lungenmikrosomenprobe;
Inkubationsbedingungen: ^{3}H-B[*c*]PH: 5µM; Mikrosomen: 0,5 mg Protein/ml; Inkubationszeit 60: min

Die Bildungsraten für B[*c*]PH-3,4-DH in der aktiven Probe lag um den Faktor 10 niedriger als der Wert, der durchschnittlich für Lebermikrosomen-Inkubationen beobachtet wird. Um zu klären, inwieweit CYP 1A1, die dominierende Isoform in humanem Lungengewebe (Shimada et al. 1992), an der Aktivierung von B[*c*]PH beteiligt ist, wurde die Inkubation der aktiven Lungenmikrosomenprobe unter Zusatz des CYP 1A1/1A2 Inhibitors α-NF durchgeführt. Der Metabolismus wurde schon bei einer sehr geringen Inhibitorkonzentration von 1 µM α-NF vollständig gehemmt. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung von CYP 1A1 an der Aktivierung von B[*c*]PH in humaner Lunge hin. Zudem ist CYP 1A1 in humaner Lunge durch PAK induzierbar. Die Beteiligung von CYP 1A1 an der Aktivierung in humanem Lungengewebe ist für andere PAK wie 5-Methylchrysen und Chrysen bereits belegt (Köhl et al., 1996; 1) 2)). V79-Zellen, die CYP 1A1 exprimieren zeigen effektive Bildung sowohl von B[*c*]PH-3,4- als auch von B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetaboliten (Seidel et al., 1998), was mit den Verhältnissen in der aktiven humanen Lungenprobe korreliert.

Weitere Hinweise auf die Beteiligung von CYP 1A1 an der B[*c*]PH-Aktivierung in humanen Mammacarcinomzellen (MCF-7) wurden von Einolf et al., (1997) erhalten. Nach Induktion des Enzyms wurde verstärkte B[*c*]PH-DNA-Adduktbildung beobachtet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse deutliche Unterschiede im B[*c*]PH-Metabolitenprofil zwischen menschlicher Leber und Lunge. B[*c*]PH ist ein gutes Substrat für Humanlebermikrosomen und wird dort hauptsächlich zu B[c]PH-3,4-DH umgesetzt. Humane Lungenmikrosomen besitzen hingegen nur sehr geringe Aktivität beim B[*c*]PH-Metabolismus. Aktive Proben generieren B[*c*]PH-5,6-DH als Hauptmetaboliten, jedoch auch bedeutende Anteile an B[*c*]PH-3,4-DH werden gebildet. Dies ähnelt dem Metabolitenprofil in Ratten- und Schweinelebermikrosomen überein.

4.2 Genotoxizität und Mutagenität von PAK-Dihydrodiolen nach Aktivierung mit humanen CYP 450-Isoenzymen

Weiterhin wurde geprüft, inwieweit B[*c*]PH-Dihydrodiole durch humane CYP 450-Enzyme zu genotoxischen und mutagenen Verbindungen aktiviert werden, und damit auch der zweite Aktivierungsschritt vollzogen wird. Hierzu wurde die Fähigkeit der Verbindungen zur Induktion der SOS-Antwort in *S. typhimurium* TA 1535 pSK 1002 untersucht. Die Verbindungen wurden dabei extern durch humane Lebermikrosomen aktiviert. Weiterhin sollte die Fähigkeit der Verbindungen zur Induktion von HPRT-Mutationen in Säugerzellen (V79) untersucht werden, die humane CYP 450-Isoenzyme exprimieren.

4.2.1 Bestimmung der Genotoxizität durch Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade in S. typh TA 1535 pSK 1002

4.2.1.1 Optimierung der *umu*-Testbedingungen

Der *umu*-Test nach Shimada et al., (1994 3)) wurde modifiziert und optimiert. Der Inkubationsansatz wurde von 1 ml auf 1,5 ml erhöht und dadurch eine Vierfachbestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität ermöglicht.
Die Methode wurde zunächst durch Modellversuche mit B[*a*]P-7,8-DH und 2-Aminoanthracen, deren Aktivität im *umu*-Test bereits bekannt war, etabliert. Der Test wurde für jede Mikrosomenkonzentration als Doppelbestimmung durchgeführt.
Um kritische Arbeitsschritte zu optimieren wurde zunächst das Substrat O-Nitrophenyl-$-D-Galactopyranosid (O-NPG) direkt mit $-Galaktosidase unter Testbedingungen umgesetzt. Weiterhin wurde der Einfluß einer Ultraschallbehandlung der Bakterien vor der Umsetzung von O-NPG untersucht. Die ultraschallbehandelten Proben führten gegenüber einer unbehandelten Probe zu keiner Verbesserung der Reproduzierbarkeit.
Hierbei wurde eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Konzentration an Phenolat-Ionen bis ca. 1,4 Extinktionseinheiten festgestellt, wobei die Standardabweichung der Einzelwerte nur sehr gering ausfiel (<5%).
Der Beitrag des reinen aktivierenden Systems (bestehend aus NADP, Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase auf die Induktion der SOS-Antwort erwies sich als vernachlässigbar.

4.2.1.2 Aktivierung von PAH-Dihydrodiolen mit Humanlebermikrosomen

Im Vordergrund der Untersuchungen standen die Verbindungen B[*c*]PH-3,4-DH und B[*c*]PH-5,6-DH, welche beim B[*c*]PH-Metabolismus in humanen Leber- und Lungenmikrosomen gebildet werden (vgl. 4.1.4). Um Aussagen über ihr mögliches mutagenes Potential beim Menschen machen zu können, wurden die beiden Verbindungen im Vergleich zu der Fjord Region-Verbindung Dibenzo[*a,l*]pyren-11,12-DH (DB[*a,l*]P-

11,12-DH) zunächst auf ihr genotoxisches Potential bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen geprüft. DB[a,l]P-11,12-DH ist das proximale Kanzerogen der Fjord-Region-Verbindung DB[*a,l*]P. Als Bezug diente Benzo[*a*]pyren-7,8-DH (B[*a*]P-7,8-DH), das Präkanzerogen von B[*a*]P, dessen genotoxische und mutagene Wirkung eindeutig belegt ist. Weiterhin wurden vergleichend das genotoxische Potential von Benzo[*j*]fluoranthen-9,10-DH (B[*j*]F-9,19-DH) und Fluoranthen-2,3-DH (FLU-2,3-DH) untersucht. Beide Verbindungen sind Vorläufer von im Nager kanzerogenen Dihydrodiolepoxiden.
Zur Aktivierung wurde derselbe Satz Humanleber-Mikrosomen verwendet, der auch bei der Aufklärung des B[*c*]PH-Metabolismus verwendet wurde.

Folgende Inkubationsbedingungen wurden gewählt, sofern nicht anders angegeben:
Aus Voruntersuchungen wurde eine optimale Substratkonzentration von 50µM ermittelt.
Mikrosomen: 0,01-0,1 mg Protein/ml
Inkubationszeit: 2h
Signifikanzgrenze: 150% der Kontrolle (Shimada et al., 1994 3))

4.2.1.2.1 Benzo[*a*]pyren-7,8-Dihydrodiol

Als Positivkontrolle und als Vergleichsgröße wurde das gut untersuchte 7,8-DH der kanzerogenen Leitsubstanz B[*a*]P gewählt. In einer Reihe von früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die Verbindung in ähnlichen Systemen aktiv ist, die auch in dieser Arbeit benutzt wurden (Shimada et al., 1989; 1994 1),2); Mc Manus et al., 1990; Brian et.al., 1990, Roberts-Thomson et al. 1993).
B[*a*]P-7,8-DH induzierte *umu*-Aktivität in Abhängigkeit von der für die Aktivierung eingesetzten Menge an mikrosomalem Protein (Abb.4.11). Eine signifikante Aktivität (150% der Kontrolle) konnte bereits bei einer Mikrosomenkonzentration von 0,01 mg Protein/ml festgestellt werden.

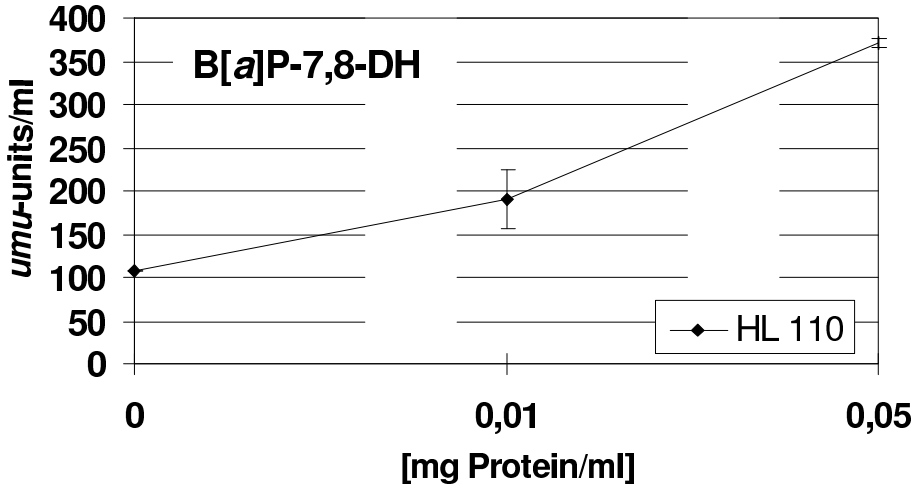


Abb.4.11 Induktion von *umu*-Aktivität in *S. typh.* TA 1535 pSK 1002 durch B[*a*]P-7,8-DH (50µM) nach Aktivierung mit humanen Lebermikrosomen
HL 110: Humanlebermikrosomenprobe mit hohem Gehalt an CYP 3A4
0: Kontrollinkubation mit gekochten Mikrosomen

4.2.1.2.2 Benzo[*c*]phenanthren-3,4-Dihydrodiol und Benzo[*c*]phenanthren-5,6-Dihydrodiol

B[*c*]PH-3,4-DH zeigte im *umu*-Test ein genotoxisches Potential vergleichbar mit dem von B[*a*]P-7,8-DH. Die durch B[*c*]PH-3,4-DH induzierte *umu*-Aktivität zeigte einen linearen Anstieg bis zu einer Mikrosomenkonzentration von 0,025mg/ml (Abb. 4.12). Für die Testung der übrigen Mikrosomen wurden die Mikrosomenmengen auf 0,01 mg Protein/ml standardisiert. Alle 18 mit B[*c*]PH inkubierten Lebermikrosomenproben induzierten *umu*-Aktivität (17-104 *umu*-units/mg Protein x min) (Tab. 4.17). B[*c*]PH-5,6-DH wurde in 6 Mikrosomenproben getestet. Es besaß niedrige, ab einer Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml Protein signifikante genotoxische Aktivität in CYP 3A4-reichen Proben (Abb. 4.12).

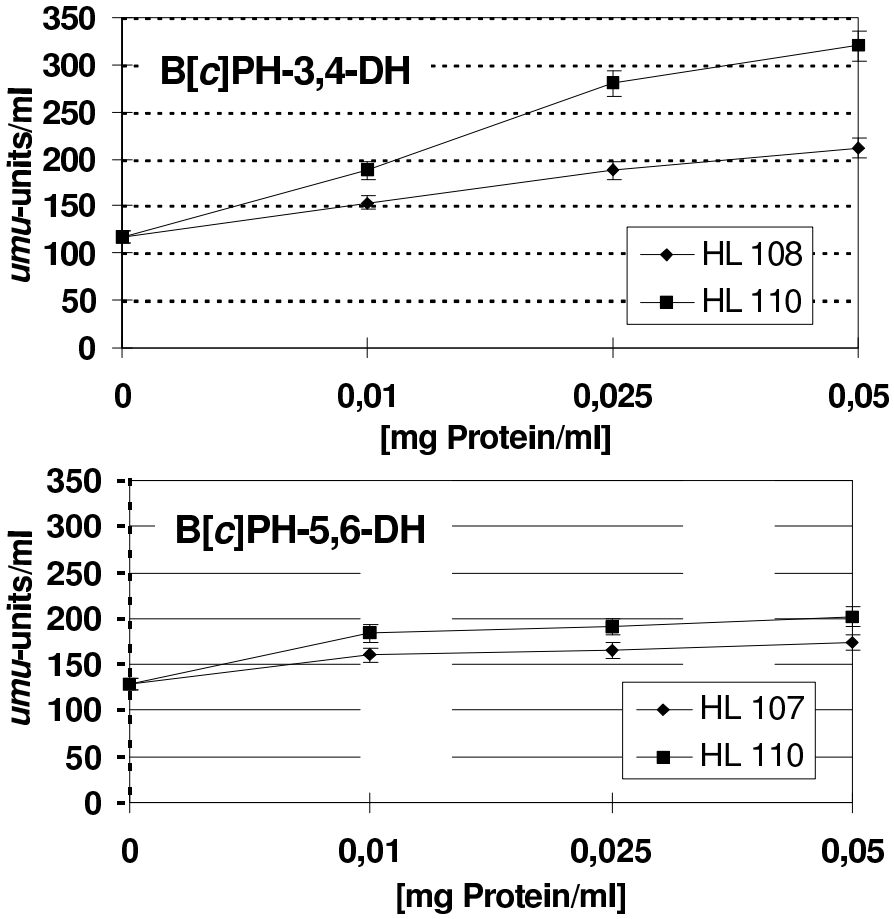


Abb. 4.12 Induktion von *umu*-Aktivität In *S.typh* TA 1535 pSK 1002 durch B[*c*]PH-Dihydrodiole (50µM) nach Aktivierung durch Humanlebermikrosomen
HL 107; HL 108: Humanleberproben mit niedrigem Gehalt an CYP 3A4
HL 110: Humanleberproben mit hohem Gehalt an CYP 3A4
0: gekochte Mikrosomen

Ähnliche Aktivitätsunterschiede zwischen B[*c*]PH-3,4-DH und B[*c*]PH-5,6-DH wurden auch in anderen Systemen beobachtet. B[*c*]PH-3,4-DH erwies sich als mutagen in *S. typh*. TA 100 und TA 98 nach externer Aktivierung mit aroclorinduzierten Rattenlebermikrosomen, während B[*c*]PH-5,6-DH nur sehr schwache Aktivität zeigte (Wood et al., 1980).

4.2.1.2.3 Dibenzo[*a,l*]pyren-11,12-Dihydrodiol

DB[*a,l*]P-11,12-DH induzierte die höchste Aktivität unter den getesteten Verbindungen. Die Induktion der *umu*-Aktivität wies einen linearen Verlauf bis zu einer Mikrosomenkonzentration von 0,025 mg Protein/ml auf (Abb. 4.13). Um die Vergleichbarkeit der Daten mit den für B[*c*]PH-3,4-DH ermittelten Ergebnissen zu gewährleisten, wurde für die Testung der übrigen Mikrosomenproben die eingesetzte Mikrosomenmenge auf 0,01 mg/ml standardisiert. In 14 von 18 Leberproben war die *umu*-Aktivität höher als für B[*c*]PH-3,4-DH gemessen (Tab. 4.18). Die hohe Aktivität der Verbindung deckt sich mit *in vivo* und *in vitro*-Daten, die die hohe biologische Aktivität von DB[*a,l*]P-11,12-DH auch in Nagersystemen belegen (Cavalieri et al., 1991).

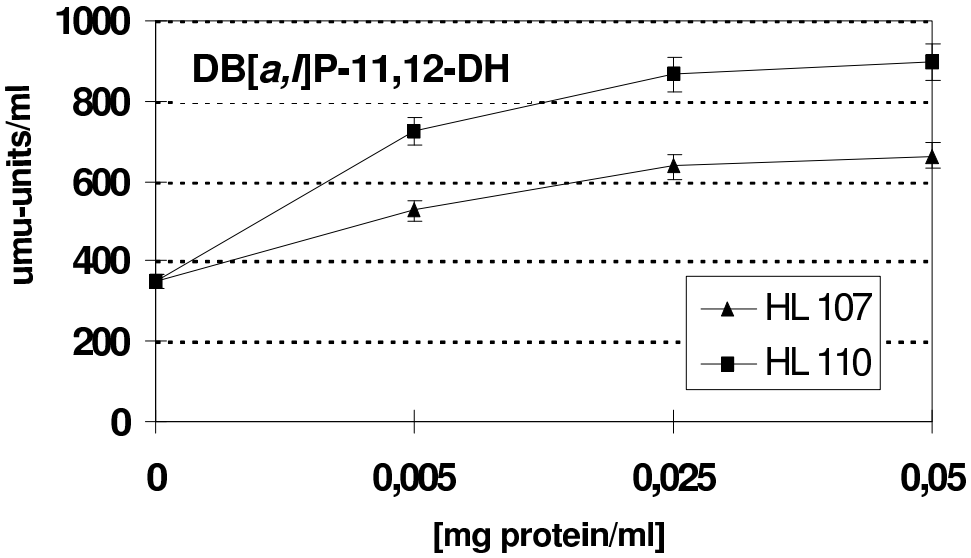


Abb. 4.13 Induktion von *umu*-Aktivität In S.typh TA 1535 pSK 1002 durch DB[a,l]P-11,12-DH nach Aktivierung durch Humanlebermikrosomen
HL 107: Humanleberprobe mit niedrigem Gehalt an CYP 3A4
HL 110: Humanleberprobe mit hohem Gehalt an CYP 3A4
0: gekochte Mikrosomen

Tab. 4.17 Induktion der *umu*-Aktivität in Salmonella typhimurium TA 1535 pSK 1002 durch B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH. Die Aktivierung erfolgte mit humanen Lebermikrosomen unter Standardbedingungen (0,01mg/ml mikrosomales Protein). Die Berechnung *umu*-Aktivität erfolgte unter Einbeziehung der Kontrollinkubation (gekochte Mikrosomen).

	PAK-Dihydrodiol	
	B[*c*]PH-3,4-DH	**DB[*a,l*]P-11,12-DH**
Humanleberprobe	**umu-Aktivität [*umu*-units/mg Protein x min]**	
39	53	38
98	41	35
100	24	24
107	64	53
108	45	69
109	33	38
110	104	132
112	31	50
115	69	124
116	41	53
118	23	18
123	38	50
126	31	33
129	43	48
130	17	55
132	28	50
133	53	60
134	66	84
Mittelwert	**45±21**	**56±30**
Bereich	**17-104**	**18-132**

4.2.1.2.4 Fluoranthen-2,3-Dihydrodiol und Benzo[*j*]fluoranthen-9,10-Dihydrodiol

Beide Verbindungen wurden mit mehreren Humanlebermikrosomenproben getestet. FLU-2,3-DH konnte mit allen Humanleberproben selbst bei hohen Mikrosomenkonzentrationen keine signifikante *umu*-Aktivität induzieren (< 7 *umu*-units/mg protein x min). B[*j*]F-2,3-DH induzierte erst bei hohen Mikrosomenkonzentrationen (0,1 mg Protein/ml) mit CYP 3A4-reichen Proben schwache Aktivität (17 *umu*-units/mg protein x min). Somit konnte die in Nagersystemen nachgewiesene deutliche biologi-

sche Aktivität der Verbindung für Systeme (Hecht et al., 1996) mit humanen CYP 450-Enzymen nicht nachvollzogen werden.

4.2.1.3 Beteiligung von CYP 450-Isoenzymen an der Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH

4.2.1.3.1 Korrelation der induzierten *umu*-Aktivitäten mit CYP 450-spezifischen Aktivitäten

Die CYP 450-Isoenzymaktivitäten der 18 Lebermikrosomen (Tab. 4.13) wurden mit den induzierten *umu*-Aktivitäten (Tab. 4.16) korreliert. Die Spearman-Korrelationsdaten sind in Tabelle 4.18 zusammengefaßt.

Tab. 4.18 Korrelationskoeffizienten [*r*] und p-Werte zwischen CYP 450-Markeraktivitäten und *umu*-Aktivität

	EROD 1A1/1A2	**MP 2C19**	**BUF 2D6**	**CZ 2E1**	**NFC 3A4**	**COUM 2A6**
B[*c*]PH-3,4-DH	**0,5046 a)**	0,3686	0,0877	-0,0186	**0,8229 b)**	0,4853
DB[*a,l*]P-11,12-DH	**0,5416 a)**	0,3681	0,0403	0,1484	**0,5460 a)**	0,2149

Fettdruck: signifikante Korrelationen
a) $p<0,05$
b) $p<0,001$

Die Ergebnisse zeigen, daß die durch B[*c*]PH-3,4-DH induzierten *umu*-Aktivitäten gut mit der CYP 3A4-Aktivität der Mikrosomen korrelieren. Eine schwächere jedoch noch signifikante Korrelation ergab sich mit der CYP 1A2-Aktivität der Mikrosomen. DB[*a,l*]P-11,12-DH zeigt gleichfalls eine gute Korrelation sowohl mit der CYP 3A4 als auch mit der CYP 1A2-Aktivität der Mikrosomen. Die Daten belegen die Bedeutung von CYP 3A4, der wichtigsten CYP-Isoform in der menschlichen Leber, für die Aktivierung der getesteten Fjord-Region-Dihydrodiole.

4.2.1.3.2 Inhibitorstudien

Zur Untermauerung der Korrelationsstudien, wurden Inkubationen in Anwesenheit des CYP 3A4-spezifischen Inhibitors Troleandomycin und vergleichend mit dem CYP 1A1/1A2 Inhibitor α-Naphthoflavon (α-NF) durchgeführt.
Die inhibierende Wirkung von α-NF auf CYP 1A2 wurde durch Inkubationen mit 2-Aminoanthracen, einem guten Substrat für CYP 1A2 (Shimada et al., 1994 1),2)), überprüft. Inkubationen in Gegenwart von 10 µM α-Naphthoflavon inhibierten nahezu 60% der durch 2-Aminoanthracen vermittelten *umu*-Aktivität in den getesteten Mikrosomenproben.
Die Aktivierung von DB[*a,l*]P-11,12-DH und B[*c*]PH-3,4-DH wurde dosisabhängig durch den CYP 3A4-Inhibitor Troleandomycin gehemmt (Abb. 4.14).

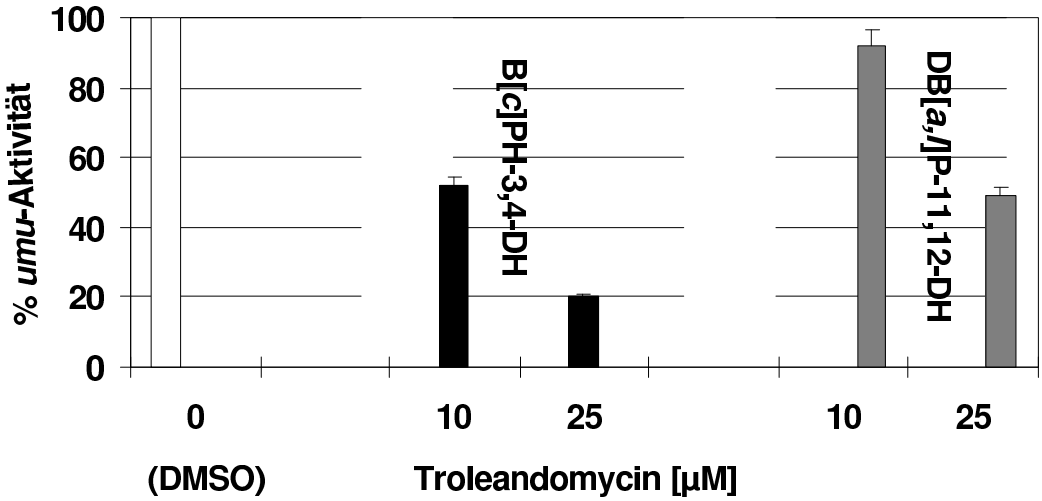


Abb. 4.14 Wirkung des CYP 3A4-Inhibitors Troleandomycin auf die Induktion der *umu*-Aktivität durch B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH nach Aktivierung mit CYP 3A4-reichen Humanlebermikrosomen

Im Gegensatz dazu führten Inkubationen in Gegenwart von α-NF zu einer 3-fachen Verstärkung der *umu*-Antwort (Abb.4.15).
Die Beobachtungen stehen in Einklang mit Daten aus der B[*c*]PH-Metabolismusstudie. In humanen Lebermikrosomen wurde in der Gegenwart von α-NF die CYP 3A4-abhängige Bildung von B[*c*]PH-5,6-Dihydrodiol 2-3-fach verstärkt. Dieses Phänomen ist für CYP 3A4-abhängige Metabolismusreaktionen gut dokumentiert. So wurde die verstärkende Wirkung von α-Naphthoflavon auf CYP

3A4-vermittelte Reaktionen bereits in früheren Studien bei der 8,9-exo-Epoxidierung von Aflatoxin B_1 und der Aktivierung von B[*a*]P-7,8-DH beobachtet (Shimada et al., 1989; Ueng et al., 1995).

Die Ergebnisse unterstützen die Korrelationsdaten, die eine dominierende Rolle von CYP 3A4 bei der Aktivierung der Fjord-Region Dihydrodiole aufzeigen (Abb.4.19).

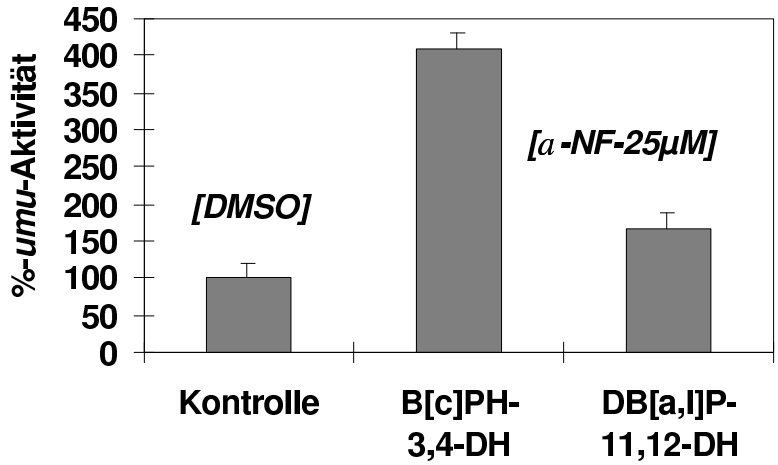


Abb. 4.15: Wirkung von α-NF auf die Induktion der *umu*-Aktivität durch B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH nach Aktivierung mit CYP 3A4-reichen Humanlebermikrosomen

4.2.1.3.3 PAK-Dihydrodiol-Aktivierung durch rekombinante humane CYP 450-Isoformen.

Die Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH und B[*c*]PH-5,6-DH wurde ergänzend mit rekombinantem CYP 3A4 und CYP 1A2 untersucht, den beiden in der Humanleber bei der Aktivierung der B[*c*]PH-Dihydrodiole beteiligten Isoenzymen sowie dem extrahepatischen CYP 1B1 (Abb, 4.16).

Mit B[*c*]PH-3,4-DH induzierte CYP 1B1 die höchste *umu*-Aktivität. Diese war um den Faktor 2 größer als jene, die für CYP 3A4 und 1A2 beobachtet wurde, die beide eine vergleichbare Aktivität besaßen. Frühere Studien belegen die Bedeutung von CYP 1B1 für die PAK-Aktivierung (Shimada et al., 1997).

B[*c*]PH-5,6-DH wurde durch CYP 1A2 und CYP 3A4 aktiviert. Beide rekombinanten CYP-Isoformen aktivierten B[*c*]PH-5,6-Dihydrodiol wesentlich effizienter als die getesteten Humanlebermikrosomen. Rekombinantes CYP 3A4 induzierte bei 25 pmol

Enzym/ml mit 298 *umu*-units/ml um den Faktor 1,5 mehr *umu*-Aktivität als CYP 1A2 mit 182 *umu*-units/ml.

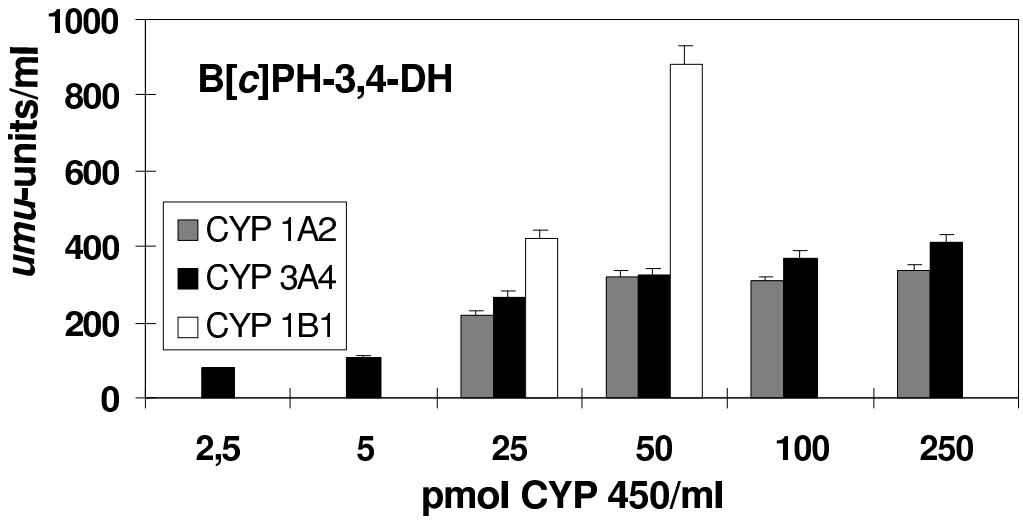


Abb.4.16 Induktion von *umu*-Aktivität in *S. typh* TA 1535 pSK 1002 nach Aktivierung mit rekombinanten humanen CYP 450-Enzymen; Kontrollinkubation mit gekochten Mikrosomen: 83-110 *umu*-units/ml

In einer Studie von Shimada et al., (1997) wurde die Induktion der SOS-Antwort in *S. typh.* TA 1535 pSK 1002 durch Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH mit rekombinanten CYP 1B1 und 1A2 bestimmt. In dieser Studie wurden die CYP-Isoenzyme aus den exprimierenden Organismen isoliert, aufgereinigt und zum mikrosomalen Enzymsystem rekonstituiert. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten wurde im rekonstituierten CYP 1A2-System keine Aktivierung des B[*c*]PH-3,4-Dihydrodiols festgestellt. Eine Erklärung hierfür kann in Unterschieden zwischen bakteriellen Membranen und rekonstituierten Enzymsystemen liegen. Auch die unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen können hierzu beitragen.

4.2.1.3.4 Zusammenfassende Betrachtung von Korrelationsstudien, Inhibitorstudien und Inkubationen mit rekombinanten humanen CYP 450-Isoenzymen

Korrelations- und Inhibitorstudien identifizierten CYP 3A4 als hauptverantwortlich für die Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH in der menschlichen Leber. Korrelationsstudien weisen weiterhin auf eine Bedeutung von CYP 1A2 hin. Die Ergebnisse wurden unterstützt durch Inkubationen mit rekombinantem CYP 1A2 und

3A4. Zusätzlich wurden B[*c*]PH-3,4-DH und auch B[*c*]PH-5,6-DH mit rekombinanten CYP-Isoenzymen inkubiert.

Mit beiden Dihydrodiolen konnte durch CYP 3A4 stärkere Genotoxizität induziert werden als durch CYP 1A2. Für das B[*c*]PH-3,4-Dihydrodiol bestätigen sich somit die mit Humanlebermikrosomen ermittelten Daten. Für B[*c*]PH-5,6-Dihydrodiol wurden Hinweise auf die Beteiligung dieser beiden Enzyme an der Aktivierung erhalten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß CYP 1B1 B[*c*]PH-3,4-DH effektiv zu aktivieren vermag.

Die Bedeutung der identifizierten Isoenzyme für den PAK-Metabolismus ist auch für die Aktivierung anderer PAK-Dihydrodiole belegt (Tab. 4.19).

Tab. 4.19 Aktivierung von PAK-Dihydrodiolen durch humane CYP 450-Enzyme im *umu*-Test

PAK-DH	aktivierendes System	beteligte CYP 450-Enzyme	Referenz
B[*a*]P-7,8-DH	rekombinante CYP 450	3A4	Shimada et al., 1989
	rekombinante CYP 450	1B1	Shimada et al., 1996
7,12-DiMe- B[*a*]A-3,4-DH[1)]	rekombinante CYP 450,oder Humanlebermikrosomen	3A4	Shimada et al., 1989
B[*b*]F-9,10-DH[2)]	rekombinante CYP 450 oder Humanlebermikrosomen	3A4	Shimada et al., 1989
	rekombinante CYP 450	1A1	Shimada et al., 1996 1)
B[*c*]PH-3,4-DH	rekombinante CYP 450	1B1	Shimada et al., 1996 1)
5-MeCHR-1,2-DH	rekombinante CYP 450	1B1	Shimada et al., 1996 1)
	Humanlebermikros.	3A4	Köhl et al,1996 3).
5-MeCHR-7,8-DH	Humanlebermikros.	3A4	Köhl et al., 1996 3)
DB[*a,l*]P-11,12-DH	rekombinante CYP 450	1B1	Shimada et al., 1996 1)

[1)] 7,12-Dimethylbenzo[*a*]anthracen

[2)] B[*b*]F: Benzo[*b*]fluoranthen

Die Ergebnisse konnten zeigen, daß CYP 3A4 und CYP 1A2 in Humanleber eine wesentliche Funktion für die Aktivierung der getesteten Fjord-Region-PAK-Dihydrodiole spielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch extrahepatisches CYP 1B1 eine hohe Aktivität bei der Aktivierung des B[*c*]PH-3,4-Dihydrodiols besitzt.

4.2.2 Mutagenität der PAK-Dihydrodiole: Bestimmung der HPRT-Vorwärts-Mutationen in V79 h3A4OR-Zellen

4.2.2.1 Mutagenität

Ergänzend zu den Daten aus den *umu*-Genotoxizitätstests wurde die Mutagenität der PAK-Dihydrodiole B[*c*]PH-3,4-DH, B[*c*]PH-5,6-DH, DB[*a,l*]P-11,12-DH und B[*a*]P-7,8-DH untersucht. Als Testsystem diente die Induktion von HPRT-Vorwärtsmutationen in genetisch modifizierten V79 Zellen, die humanes CYP 3A4 zusammen mit humaner NADPH-Oxidoreduktase exprimieren, sogenannten V79h3A4OR-Zellen (Schneider et al., 1996). Als Positivkontrolle diente Aflatoxin B_1, ein Substrat, das CYP 3A4-abhängig metabolisiert wird. Zellen, die spezifisch CYP 3A4 exprimieren wurden gewählt, da die vorhergehenden Untersuchungen auf eine dominante Rolle von CYP 3A4 bei der Aktivierung der PAK-Dihydrodiole belegen.

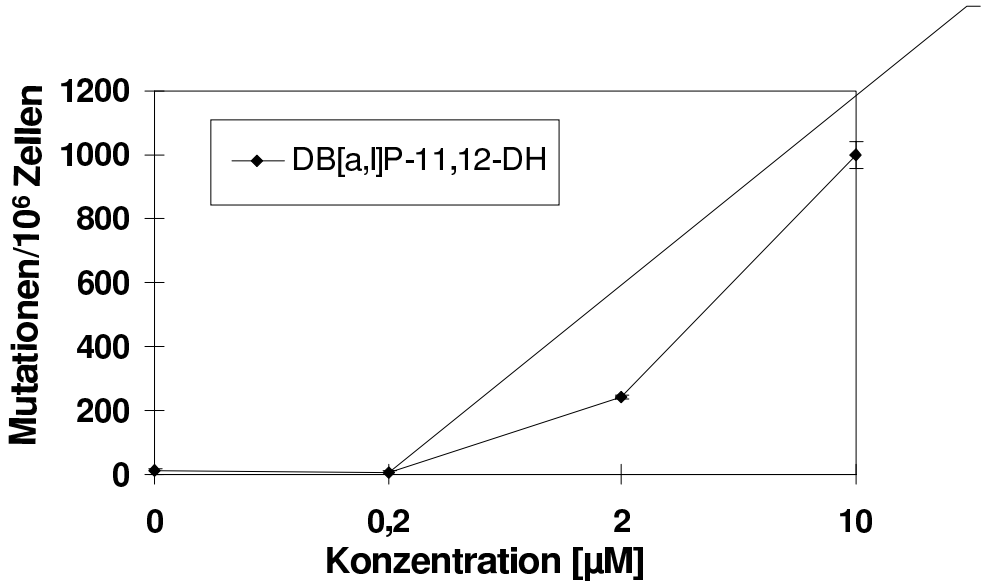


Abb. 4.17 Induktion von HPRT-Mutationen in V79 h3A4 OR-Zellen durch DB[*a,l*]P-11,12-DH; Inkubationszeit: 24h

DB[*a,l*]P-11,12-DH zeigte die stärkste dosisabhängige mutagene Aktivität in Konzentrationen größer als 0,2 µM (Abb. 4.17). 10µM DB[*a,l*]P-11,12-DH führte bereits zu 1000 Mutationen/ 1 Mio Zellen. Die Cloning Efficiency (überlebende Zellen während der Selektion) lag generell über 60%, in den häufigsten Fällen bei 80%. Die Mutationsraten wurden auf die jeweilige Cloning Efficiency bezogen.

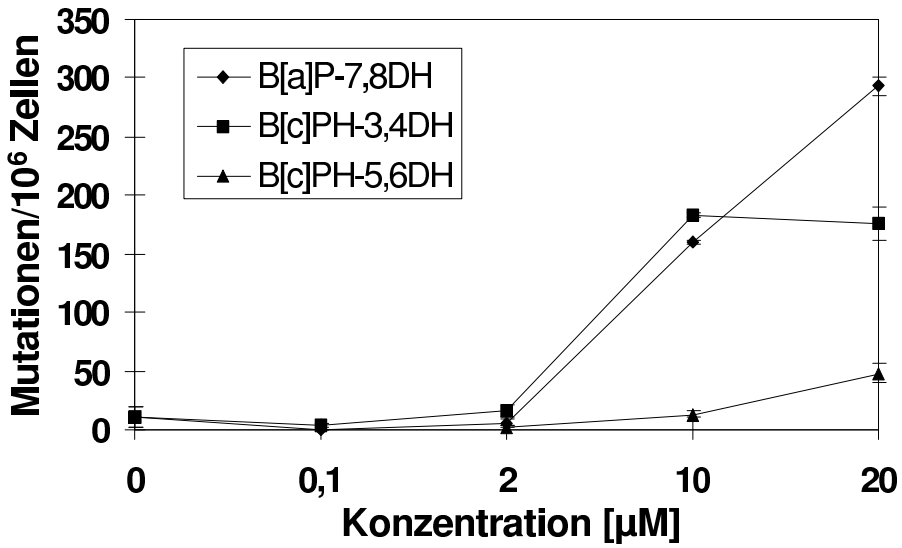


Abb.4.18 Induktion von HPRT-Mutationen in V79 h3A4 OR-Zellen durch B[*c*]PH-3,4-DH, B[*c*]PH-5,6-DH und B[*a*]P-7,8-DH; Inkubationszeit: 24h

B[*c*]PH-3,4-DH wies vergleichbare Aktivität zu B[*a*]P-7,8-DH auf. B[*c*]PH-5,6-DH besaß geringe aber signifikante Aktivität (Abb. 4.18). 4-OH B[*c*]PH als weiterer humaner B[*c*]PH-Metabolit, B[*j*]F-9,10-DH und FLU-2,3-DH konnten keine HPRT-Mutationen induzieren. Die Anzahl von Mutationen in der Kontrolle lag in allen Tests bei 10 - 15 Mutationen/10^6 Zellen.

Eine starke mutagene Potenz von DB[*a,l*]P-11,12-DH in V79-Zellen nach externer Aktivierung durch humane MCF-7 Zellen wurde schon in früheren Arbeiten beschrieben (Ralston et al., 1997).

B[*a*]P-7,8-DH erwies sich bereits im V79/HPRT-Test in einer Konzentration von 35µM (MF: 1200/10^6 Zellen) nach externer Aktivierung durch Ratten S9-Mix als mutagen (Glatt, 1993).

4.2.2.2 Cytotoxizität von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH

Die allgemeine Cytotoxizität der Verbindungen wurde durch Messung der Gesamtzellzahl im Inkubationsansatz nach der Inkubation (1.Passage) durch Zellzählung bestimmt und auf die Kontrollinkubation bezogen

DB[*a,l*]P-11,12-DH wies eine starke Cytotoxizität auf, die bei Substratkonzentrationen von 20 µM zum fast vollständigen Absterben der Zellen führte, während das gleichfalls mutagene B[*c*]PH-3,4-DH nur eine geringe Cytotoxizität aufwies (Abb. 4.19). Bei 10 µM DB[*a,l*]P-11,12-DH überlebten bei einer Mutationsfrequenz von 1000 Mutationen/ 10^6 Zellen nur 20% der Zellen. *In vivo*-Daten beschreiben ebenfalls die starke cytotoxische Wirkung von DB[*a,l*]P-11,12-DH nach subkutaner Applikation bei der Maus oder Injektion in die Brustdrüse der Ratte (Cavalieri et al, 1989; 1991).

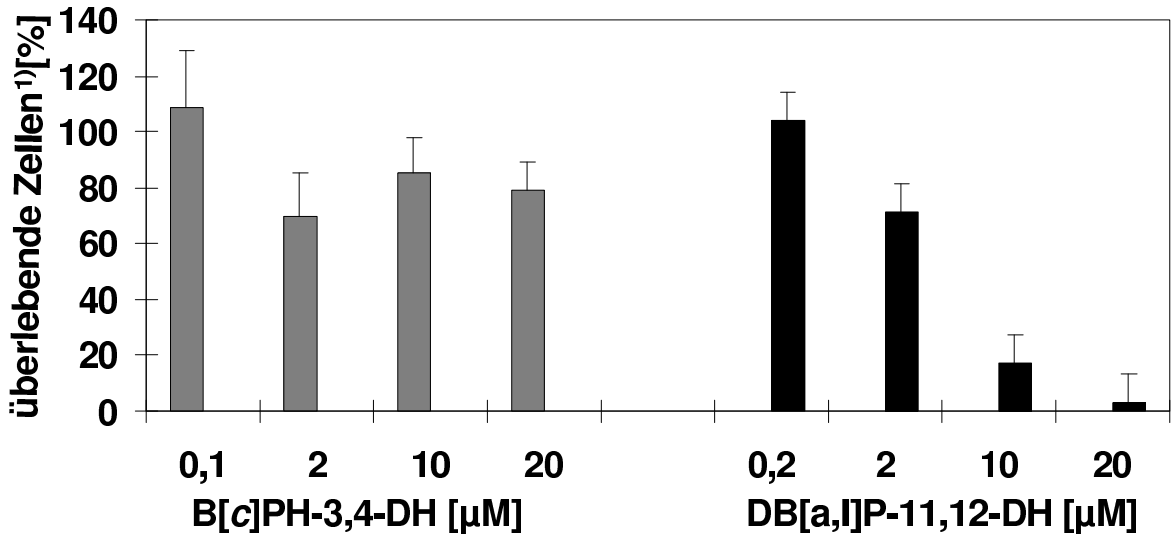


Abb. 4.19 Cytotoxizität von Fjord-Region-Dihydrodiolen in V79 h3A4 OR-Zellen

Die hohe Cytotoxizität von DB[*a,l*]P sowie DB[*a,l*]P-11,12-DH wird dafür verantwortlich gemacht, daß die Kanzerogenität der Verbindungen geringer ist als erwartet. Die Tumorrate in der Maus sinkt ab einer Dosis von 4 nmol im Initiations-Promotionsmodell, während jene für B[*a*]P ansteigt (Higginbotham et al., 1993). Es wird davon ausgegangen, daß Zellen, in denen ein genotoxischer Schaden induziert wurde, absterben, bevor sich eine Mutation manifestieren kann.

4.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der *umu*-Genotoxizitätstests und HPRT-Mutagenitätstests

Getestet wurden die PAK-Dihydrodiole im *umu*-Genotoxizitätstest mit externer Aktivierung durch humane Lebermikrosomen sowie im HPRT-Mutagenitätstest in V79-Zellen, die humanes CYP 3A4 exprimieren. DB[*a,l*]P-11,12-DH erwies sich als die aktivste Verbindung in beiden Systemen, gefolgt von B[*c*]PH-3,4-DH, welches vergleichbare Mutagenität mit B[*a*]P-7,8-DH aufwies. Die Fähigkeit der Testsubstanzen zur Induktion von HPRT-Vorwärtsmutationen in V79 h3A4 OR-Zellen korrespondiert gut mit den im *umu*-Test ermittelten Daten.

Damit ist eindeutig belegt, daß B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH durch humane CYP 450 Isoenzyme zu genotoxischen und mutagenen Metaboliten aktiviert werden können.

Die Ergebnisse korrelieren mit Kanzerogenitätsstudien in Nagern. DB[*a,l*]P-11,12-DH erwies sich als wesentlich kanzerogener im Vergleich zu B[*a*]P-7,8-DH in der Brustdrüse der Ratte sowie in der Mäusehaut, ebenso wie die beiden Ausgangsverbindungen DB[*a,l*]P und B[*a*]P (Cavalieri et al., 1991). Ähnliche Verhältnisse gelten auch für die DH-Epoxide der Verbindungen. In V79-Zellen erwies sich *anti*-DB[*a,l*]P-11,12-DH-13,14-Epoxid um Faktor 40 mutagener als *anti*-B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxid, welches vergleichbare Aktivität mit anti-B[*a*]P-7,8-DH-9,19-Epoxid aufwies (Seidel et al., 1994).

Für FLU-2,3-DH und B[*j*]F-9,10-DH konnte sowohl nach Aktivierung mit humanen Lebermikrosomen als auch in humanen V79 h3A4-Zellen keine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Eine Aktivierung der Verbindungen durch humane CYP 450-Enzyme scheint somit nicht stattzufinden.

Die Daten belegen eindeutig die Bedeutung des hepatischen CYP 450-Isoenzyms 3A4 sowie die geringere Bedeutung von CYP 1A2 für die Aktivierung von B[*c*]PH-3,4-DH und DB[*a,l*]P-11,12-DH zu genotoxischen und mutagenen Metaboliten. Auch das extrahepatische CYP 1B1 scheint B[*c*]PH-3,4-DH effektiv zu aktivieren. Die mit humanem Gewebematerial gewonnenen Daten sowie die Mutagenitätsstudien in CYP 3A4 exprimierenden V79-Zellen stehen damit im Gegensatz zu B[*c*]PH-Metabolismusstudien in V79-Zellen, die humane CYP 450-Isoenzyme exprimieren. Lediglich solche Zellen, die humanes CYP 1B1 exprimieren konnten B[*c*]PH-3,4-DH

zu Tetraolen als Folgeprodukte der DH-Epoxide metabolisieren, während in solchen, die humanes CYP 1A2 und 3A4 exprimieren, kein Metabolismus von B[*c*]PH-3,4-DH nachweisbar war (Seidel et al., 1998). Ein Grund hierfür kann in den unterschiedlichen Testbedingungen liegen.

5 Zusammenfassung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen eine Gruppe von möglichen Kanzerogenen dar, die ihre mutagene und kanzerogene Wirkung erst nach einer zweistufigen biologischen Aktivierung zum Dihydrodiolepoxid entfalten.
Der ubiquitär in der Umwelt vorkommende PAK Benzo[*c*]phenanthren ist in Nagersystemen *in vitro* und *in vivo* nur schwach biologisch aktiv, während die korrespondierenden Fjord-Region-B[*c*]PH-3,4-Dihydrodiol-1,2-Epoxide zu den am stärksten kanzerogenen PAK-Dihydrodiolepoxiden gehören. Die geringe Bildung von B[*c*]PH-3,4-DH als Vorstufe der B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide im Nager wird für die geringe biologische Aktivität von B[*c*]PH verantwortlich gemacht. Bisher waren nur wenige Daten zur Beurteilung der Aktivierungskapazität in menschlichem Gewebe verfügbar.
In dieser Studie konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, daß Gewebepräparationen aus Humanleber B[*c*]PH effizient zu genotoxischen und mutagenen Metaboliten aktivieren. Im Gegensatz zu Leberpräparationen von Ratte und Schwein, in denen mit der bevorzugten Bildung des B[*c*]PH-5,6-DH detoxifizierende Metabolismuswege dominieren, wird in humanen Leberpräparationen bevorzugt B[*c*]PH-3,4-DH als Vorläuferverbindung der ultimal kanzerogenen B[*c*]PH-3,4-DH-1,2-Epoxide gebildet.

Von den in der menschlichen Leber vorhandenen Cytochrom P450-Enzymen erwies sich CYP 1A2 als hauptverantwortlich für die metabolische Aktivierung von B[*c*]PH. CYP 3A4 scheint für die Bildung von B[*c*]PH-5,6-DH mitverantwortlich zu sein. Beide Isoenzyme werden in der Leber stark exprimiert und besitzen eine Schlüsselfunktion bei der PAK-Aktivierung.
Im Gegensatz zu humanen Lebermikrosomen erwiesen sich humane Lungenmikrosomen im wesentlichen als inaktiv. Die einzige aktive humane Lungenprobe generierte neben dem überwiegenden Metaboliten B[*c*]PH-5,6-DH auch bedeutende Anteile B[*c*]PH-3,4-DH. Studien mit CYP 450-Inhibitoren belegen eine Bedeutung von CYP 1A1 für die Aktivierung in der menschlichen Lunge, welches durch Zigarettenrauch induzierbar ist. Auch das extrahepatisch vorkommende CYP 1B1, welches vor allem in der Niere, dem Uterus und der Brustdrüse vorkommt, metabolisierte B[*c*]PH effektiv.

Auch der zweite Schritt der Aktivierungskaskade wurde untersucht. B[*c*]PH-3,4-DH konnte durch humane Lebergewebepräparationen zu genotoxischen Metaboliten aktiviert werden. Die induzierte Genotoxizität war vergleichbar mit der des kanzerogenen B[*a*]P-7,8-DH. CYP 3A4 konnte als hauptverantwortlich für die Aktivierung identifiziert werden. Auch für humanes CYP 1B1 ist B[*c*]PH-3,4-DH ein gutes Substrat. Im Gegensatz dazu induzierte B[*c*]PH-5,6-DH nur geringe Genotoxizität.
Nach Aktivierung in V79-Säugerzellen, die humanes CYP 3A4 exprimieren, wirkte B[*c*]PH-3,4-DH mutagen, vergleichbar mit B[*a*]P-7,8-DH.
Schwache Mutagenität konnte auch für B[*c*]PH-5,6-DH nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden die Fjord-Region-Verbindung Dibenzo[*a,l*]pyren-11,12-Dihydrodiol (DB[*a,l*]P-11,12-DH), Benzo[*j*]fluoranthen-9,10-Dihydrodiol (B[*j*]F-9,10-DH), und Fluoranthen-2,3-Dihydrodiol (FLU-2,3-DH) untersucht. DB[*a,l*]P-11,12-DH war im Genotoxizitäts- sowie Mutagenitätstest am stärksten aktiv und induzierte 10-fach mehr HPRT-Mutationen als B[*c*]PH-3,4-DH und B[*a*]P-7,8-DH. B[*j*]F-9,10-DH zeigte nur im Genotoxizitätstest schwache Aktivität, während FLU-2,3-DH in beiden Systemen inaktiv war.
Humanes CYP 3A4 und zu geringerem Ausmaß CYP 1A2 konnten als hauptverantwortlich für die Aktivierung von DB[*a,l*]P-11,12-DH identifiziert werden.

Somit konnte diese Studie zeigen, daß B[*c*]PH durch CYP 450-Enzyme in humanem Gewebe zu genotoxischen und mutagenen Verbindungen aktiviert werden kann. Im Tierexperiment ermittelte Daten haben dagegen eine vorrangige Metabolisierung zu wenig mutagenen Metaboliten ergeben. Sie korrelieren mit dem Befund des geringen kanzerogenen Potentials im Tierexperiment. Im Gegensatz dazu wird B[*c*]PH in humanen Gewebepräparationen effizient zu mutagenen Endprodukten aktiviert. Die Ergebnisse zeigen, daß für die Risikobewertung wesentliche Unterschiede beim B[*c*]PH-Metabolismus zwischen Mensch und Nager bestehen und die Ratte im Falle von B[*c*]PH kein prädiktives Modell für die Biotransformation beim Menschen darstellt.
Es konnte gezeigt werden, daß für die Aktivierung von B[*c*]PH in menschlichem Lebergewebe eine Kombination des induzierbaren CYP 1A2 (1. Aktivierungsschritt)

und des Hauptenzyms der Humanleber CYP 3A4 (2. Aktivierungsschritt) für eine effiziente Aktivierung verantwortlich ist.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, daß B[*c*]PH eine Bedeutung für die Entstehung von Krebs beim Menschen besitzt.

6.Material und Methoden

6.1 Geräte

HPLC mit Online-Radiodetektor und UV-Detektor

HPLC-Pumpe: Niederdruckgradientenpumpe L-6200A Intelligent Pump (Merck-Hitachi)

Radioaktiv-Detektor für die Online-Radiodetektion: Radiomatic Flo-One beta A-500 (Packard)

UV-Detektor: GAT-LCD-501 (Gamma Analysen Technik GmbH)

Injektionsschleife: Rheodyne 500µl

HPLC-Trennsäulen:

Metabolismusstudie: Umkehrphase

C18-Säule: Octadecylsilan 4,6 x 250mm (Vydac)

Aufreinigung von ^{3}H B[*c*]PH: Normalphase

Li-Chrosorb Si 60-Säule 5µM (Merck)

Photometer:

Proteinbestimmung: UV/VIS-Photometer Uvikon 930 Spektrometer (Kontron)

CYP 450-Bestimung: UV/VIS-Spektrophotometer 1 Bio (Cary)

EROD-Assay: Fluoreszenzspektrometer RF-510 LC mit (Shimadzu)

Thermostat D3 (Haake)

Gewebe-Homogenisator (Schütt)

Zentrifugen

Ultrazentrifuge: Centricon T-2055 (Kontron)

Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf)

pH-Meter 521 (WTW)

Vortex-Genie (Bender und Hobein)

Wasserbad	(Julabo)
Thermomixer	(Eppendorf)

Zellkultur

Brutschrank:	Cytoperm	(Heraeus)
Sterilbank:	LaminAir HLB BS	(Heraeus)
Auflichtmikroskop:		(Zeiss)
Wasserbad:		(Julabo)
Zentrifuge:	Minifuge	(Heraeus)
Neubauerzählkammer		
Biofreezer:	Herafreeze	(Heraeus)

6.2 Verbrauchsmaterial

Kulturflaschen mit Kontaminationsschutz 75 cm^3	(Greiner)
Kryoröhrchen, steril 2,2 ml	(Nunc)
Petrischalen Polystyrol, steril	(Sarstedt, Nunc)
Sterilfilter 0,2 µM	(Sartorius)

6.3 Chemikalien

6.3.1 Testsubstanzen

[G-^{3}H]-Benzo[*c*]phenanthren hergestellt durch katalytischen Tritiumaustausch (0,1 Ci/mmol) (Amersham); aufgereinigt durch Normalphasen-HPLC (wie unter 5.6.1.1 beschrieben)

Die folgenden Verbindungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. S. Amin; American Health Foundation, Valhalla NY, USA zur Verfügung gestellt:

-B[*c*]PH
-B[*c*]PH-3,4-DH
-B[*c*]PH-5,6-DH
-1-OH B[*c*]PH
-2-OH B[*c*]PH
-3-OH B[*c*]PH
-4-OH B[*c*]PH
-5-OH B[*c*]PH
-DB[*a,l*]P-11,12-DH
-B[*j*]F-9,10-DH
-FLU-2,3-DH
-B[*a*]P-7,8-DH

6.3.2 sonstige Chemikalien

α-Naphthoflavon	(Sigma)
7-Ethoxy-3H-phenoxazin-3-on (Ethoxyresorufin)	(Aldrich)
7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on (Resorufin)	(Aldrich)
Glucose-6-phosphat	(Boehringer Mannheim; Sigma)
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	(Boehringer Mannheim; Sigma)
Kohlenmonoxid	
NADH	(Boehringer)
NADP	(Boehringer Mannheim; Sigma)
Natriumdithionit	(Merck)
Troleandomycin	(Sigma)

6.3.3 Scintillationscocktail

ß-Counter	Ready Safe (Beckmann)
HPLC online-Radiodetektion:	Ultima Flo ^{TM}M (Packard)

6.3.4 Zell- und Bakterienkultur

Bacto-Trypton (Casein Hydrolysat)	(Gibco)
Bacto-yeast-extract	(Gibco)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	(Gibco)
Fötales Kälberserum	(Gibco)
Geneticinsulfat	(Gibco)
L-Glutamin, 15 mg/l Phenolrot, ohne Pyruvat	(Gibco)
Natriumpyruvat	(Gibco)
Penicillin-Streptomycin-Lösung 10000 U Penicillin/l; 10000 µg Streptomycin/l	(Gibco)
Trypsin	(Serva)
Trypanblau	(Sigma)

6.4 Mikrosomen

6.4.1 Humane Leber- und Lungenproben

Die humanen Gewebeproben wurden über den Tennessee Donor Service (Nashville Tennessee) bezogen und von Herrn F.P. Guengerich, Nashville, Tennessee zur Verfügung gestellt. 75% der Organspender waren männlichen Geschlechts, Unfälle die Haupttodesursache der Spender.

6.4.1.1 Herstellung der humanen Leber- und Lungenmikrosomen

Die Herstellung der humanen Leber- und Lungenmikrosomen erfolgte durch Herrn Dr. Werner Köhl (Arbeitsgruppe Dr. S.S. Hecht American Health Foundation, Valhalla, New York).

6.4.2 Tierische Lebermikrosomen

6.4.2.1 Herstellung von Schweineleber- und Rinderlebermikrosomen

Mic I-Puffer pH 7,5:	0,25M Saccharose
	0,5mM EDTA
	0,02M Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Mic II-Puffer pH 7,6	0,15M Kaliumchlorid
	0,05M Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter Eiskühlung!

a) Gewinnung von Lebergewebe

Schweineleber bzw. Rinderleber wurde schlachtwarm vom örtlichen Schlachthof bezogen. Von jeweils 6 Tieren wurden Leberstücke von ca. 10g entnommen und sofort mit eiskekühltem Mic I-Puffer überschichtet.

b) Homogenisierung

Gleiche Anteile der 6 Leberproben wurden vereint und die 1,5-fache Gewichtsmenge an eisgekühltem MicI-Puffer zugegeben. Mit einer Schere wurden die Leberstücke in möglichst kleine Teile zerschnitten und jeweils ca. 50 ml im Zellhomogenisator dreimal gepottert und das Homogenat in einem Becherglas gesammelt.

c) Fraktionierte Zentrifugation

Die einzelnen Zentrifugationsschritte wurden bei 2°C durchgeführt

1. Zentrifugation: Erhalt der S-9 Fraktion durch Abtrennung von Geweberesten, Zellkernen und Mitochondrien

Programm: 10 Minuten 100 x g
10 Minuten 300 x g
10 Minuten 9000 x g

Die als Überstand erhaltene S-9 Fraktion wird abdekantiert und gesammelt.

2. Zentrifugation: Abtrennung der Mikrosomenfraktion

Der S-9 Mix wurde 1h bei 100000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wird die Fettschicht vorsichtig mittels einer Glaskapillare und Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Das Cytosol wird abdekantiert. Das Pellet, das die Mikrosomen enthält wird mit MIC I-Puffer überschichtet und durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und so vom Glykogen abgetrennt, das als glasiger Fleck im Zentrifugenglas zurückbleibt. Die Suspension wird anschließend mit dem Handpotter homogenisiert.

3.Zentrifugation: Reinigung der Mikrosomenfraktion

Die Mikrosomensuspension wird unter gleichen Bedingungen wie bei Schritt 2 zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet in Mic II-Puffer resuspendiert (0,5 ml Puffer pro eingesetztes g Leber). Nach erneutem Homogenisieren mit dem Handpotter werden die Microsomen in Epicaps zu 0,5ml Aliquoten abgefüllt und bei -80°C im Biofreezer eingefroren.

6.4.2.2 Herstellung von Rattenlebermikrosomen

Die Herstellung der Rattenlebermikrosomen erfolgte durch Frau Maria Lorez und Frau Anja Friedel

Aroclorinduction und Phenobarbitalinduktion der Ratten

a) Aroclorinduktion

Männlichen Wistarratten wurde einmalig 20mg Aroclor in 250µl Sesamöl pro 100g Körpergewicht i.p. injiziert, die Tiere nach 4 Tagen getötet und die Leber entnommen.

b) Phenobarbitalinduktion

Männliche Wistarratten erhielten phenobarbitalhaltiges Trinkwasser (1g Phenobarbital/Liter Leitungswasser). Die Trinkmenge betrug ca 100 ml/Tier in 5 Tagen. Nach fünf Tagen wurden die Tiere getötet und die Leber entnommen.

c) Präparation der Mikrosomen

Die Herstellung der Mikrosomen erfolgte wie unter 6.4.2.1 beschrieben. Die Resuspendierung des Mikrosomenpellets erfolgte in einer Mic II-Puffermenge von 1ml/g eingesetzter Leber.

6.4.3 Bestimmung des Proteingehaltes in Lebermikrosomen

Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension wird mit Hilfe des BCA Protein Assay (Pierce) durchgeführt. Die Methode wurde für die Proteinbestimmung in Mikrosomen empfohlen (Guengerich, 1989). Bei der stattfindenden Biuret-Reaktion reduzieren Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+} Ionen, die mit 2 Molekülen Bicichoninsäure ein purpurfarbenes Reaktionsprodukt bilden, welches eine starke Absorption bei 562 nm zeigt. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe verschiedener Verdünnungen einer Albumin-Standardlösung erstellt. Die Durchführung des Tests erfolgt nach der Standardvorschrift des Herstellers.

6.4.4 Quantitative Bestimmung des CYP 450 und Cytochrom b_5-Gehaltes

Mic II-Puffer (siehe 5.4.2.1)

Die quantitative Bestimmung der CYP 450 und Cytochrom b_5-Gehalte in den tierischen Lebermikrosomen erfolgt differenzspektrometrisch nach einem von Omura und Sato (1964) entwickelten Verfahren (Schoene et al, 1972).

Cytochrom b_5-Bestimmung

Die Lebermikrosomen werden mit Mic **II**-Puffer auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml verdünnt. Von der Verdünnung werden jeweils 2,5 ml in zwei Photometer-Quarzküvetten gefüllt und diese in den beiden Strahlengängen des Photometers platziert. Nach Aufnahme der Grundlinie wird in der ersten Küvette das vorhandene Cytochrom b_5 reduziert und ein Differenzspektrum im Bereich von 390-500 nm aufgenommen. Das Spektrum zeigt ein scharfes Signal bei 424 nm.

CYP 450-Bestimmung

Die Reduktion des Cytochrom P450 durch NADH erfolgt im Gegensatz zu Cytochrom b_5 nur sehr langsam. Zudem bindet Cytochrom b_5 kein Kohlenmonoxid. Daher kann noch in der gleichen Probenlösung durch Zugabe weniger Körnchen Natriumdithionit in beide Küvetten und Einleiten von CO (1min) in die Probenküvette der Gehalt an Cytochrom P450 bestimmt werden.Das Spektrum im Bereich von 390-500 nm weist einen großen Peak bei 450 nm, eine Schulter bei 420 nm und einen tiefen Trog bei 410 nm auf.

Berechnung des CYP 450 und des Cytochrom b_5-Gehaltes

Cytochrom b_5

Aus dem Wert E_{424nm}-E_{450nm} =E wird die Konzentration berechnet

c(b_5) [nmol/mg] Protein = E x 9,53/Proteinkonzentration

Cytochrom P450

c (CYP 450) [nmol/mg Protein] = E x 10.989/Proteinkonzentration

6.4.5 Bestimmung der CYP 450-Isoenzymaktivitäten

6.4.5.1 Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität

Die Bestimmung der Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität erfolgt nach Burke et al., (1983) durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz des Resorufins, das bei der CYP 1A1/1A2-vermittelten Desalkylierung gebildet wird. Die Meßwerte werden am Fluoreszenzspektrometer in Abständen von 30 Sekunden abgelesen. Die Angabe der Fluoreszenzintensitäten erfolgt in Skalenteilen.

Phosphatpuffer 1M, pH 7,6:
Eine 1M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung wird mit einer 1M Kaliumdihydrogenphosphatlösung auf pH 7,6 titriert.

Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers:
Anregungswellenlänge: 530 nm
Emissionswellenlänge: 585 nm
Spaltbreite: jeweils 10 nm
Empfindlichkeit (Gain): 100

Durchführung
Der Inkubationsansatz befindet sich während der gesamten Messung im Strahlengang des Fluoreszenzspektrometers, dessen Küvettenhalterung mittels Thermostat auf 37°C temperiert ist. Die Zeitdauer der Messungen beträgt 10-30 min. Zunächst werden die leeren Küvetten auf 37°C temperiert. Anschließend werden alle Bestandteile des Inkubationsansatzes mit Ausnahme der NADPH-Lösung in die Küvette pipettiert. Nach Durchmischung wird der Cocktail bei 37°C 1 Minute äquilibriert, anschließend die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Am Ende jeder Messung werden je 10µl Resorufinlösung als Kontrolle und interner Standard zugegeben und die jeweilige Fluoreszenzzunahme gemessen.
Jede Bestimmung wurde in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

Schema 6.1

Pipettierschema für den EROD-Assay (Gesamtvolumen 2ml)	
200 µl	1M Phosphatpuffer
1760-1780 µl	H_2O bidest
0-20 µl	Mikrosomensuspension
10 µl	**1mM Ethoxyresorufin-Lösung in DMSO, Durchmischung**
1 Minute bei 37°C äquilibrieren lassen	
10 µl	**50 mM NADPH-Lösung, Durchmischung**

Zusätzlich zum internen Resorufin-Standard wurde eine Resorufin-Eichgerade mit verschiedenen Resorufinkonzentrationen angefertigt, die im Bereich der bei den Inkubationen zu erwartenden Konzentrationen lagen. Die Eichgerade wies im verwendeten Konzentrationsbereich einen linearen Verlauf auf.

Vorversuche wurden mit Hilfe von Schweinelebermikrosomen durchgeführt, deren Gesamt CYP 450-Gehalt im Bereich derer der menschlichen Mikrosomen lag.

Berechnung der EROD-Aktivität

$$\textbf{Resorufin [pmol x mg Protein}^{-1}\textbf{ min}^{-1}\textbf{]} = \frac{\Delta \mathbf{y} \times \mathbf{Z}}{\mathbf{y} \times \mathbf{t} \times \mathbf{X}}$$

Δy = Fluoreszenzzunahme in der Lösung

y = Steigung der Eichgeraden

Z = 0,002; Umrechnung auf absolute Menge Resorufin in 2 ml Lösung

t = Inkubationszeit [min]

X = Proteinmenge [mg]

6.4.5.2 Bestimmung der übrigen CYP 450-Isoenzym-spezifischen Aktivitäten

Die Charakterisierung des CYP 450-Enzymmusters mit Ausnahme der EROD-Aktivität erfolgte durch Guengerich et al. (1995 2)).

6.5 Rekombinante CYP 450-Isoenzyme

Rekombinante CYP 450-Enzyme wurden jeweils als Membranpräparationen der exprimierenden Mikroorganismen bezogen. Die Präparation erfolgte in der Arbeitsgruppe Guengerich, 1998, die Versendung unter Trockeneiskühlung.

6.6 Metabolismus von B[*c*]PH

Die Vorgehensweise wurde an frühere Studien angelehnt, bei denen der Metabolismus von Chrysen, 5- und 6-Methylchrysen und B[*a*]P bestimmt wurde (Köhl et al,1996 1), 2); Staretz et al., 1996)

6.6.1 Charakterisierung der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung

6.6.1.1 Aufreinigung der ^{3}H B[*c*]PH-Stammlösung

Die Analyse der unaufgereinigten-^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung sowie die Kontrollinkubationen mit gekochten Schweinelebermikrosomen lieferten Peaks, die mit B[*c*]PH-Hydroxyverbindungen koeluierten und somit in den Metabolismusstudien zu falsch-positiven Ergebnissen führen konnten.
Die ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung wurde daher mittels Normalphasen HPLC aufgereinigt.

Hierzu wurde ein Gradientenprogramm zur Abtrennung von B[*c*]PH von den hydroxilierten B[*c*]PH-Metaboliten entwickelt.

Schema 6.2 Gradientenprogramm zur Aufreinigung von B[*c*]PH mittels Normalphasen-HPLC

Zeit [min]	**Hexan [%]**	**Dichlormethan[%]**	**Flow [ml/min]**
0	100	0	0,5
25	100	0	0,5
30	100	0	1,0
90	0	100	1,0
100	100	0	0,5

Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen gesammelt:

Elutionszeit [min]	0-4	4-5	5-8	8-10	10-14	14-68
Fraktionsnummer	1	2	3	4	5	6-13

Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden mit der unter 5.6.2 beschriebenen Umkehrphasen HPLC chromatographiert. Die Fraktionen 2-10 enthielten B[*c*]PH, hiervon die Fraktionen 2 und 3 den Haupanteil, in den Fraktionen 6-10 wurden neben B[*c*]PH weitere Verbindungen als Verunreinigungen nachgewiesen, während in den Fraktionen 11-13 nur hydroxylierte B[*c*]PH-Metabolite nachgewiesen wurden. Die reinen B[*c*]PH-Fraktionen 2-5 wurden vereint und die Lösung im Stickstoffstrom stark eingeengt. Anschließend wurde die Aktivität eines Aliquots des aufgereinigten Substrats im Vergleich zu einem Aliquot unaufgereinigter Stammlösung im ß-Coun-ter vermessen und auf die ursprüngliche Aktivität mit Toluol rückverdünnt. Die ^{3}H-B[*c*]PH-Ausbeute betrug 79%.

6.6.1.2 Konzentration der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung

Die Bestimmung der Konzentration der ^{3}H B[*c*]PH-Stammlösung erfolgte über eine Eichgerade mit unmarkiertem B[*c*]PH mittels HPLC und UV-Detektion bei 280nm Die Konzentration der ^{3}H B[*c*]PH-Stammlösung betrug 10 mM ± 0,2 mM

6.6.1.3 Spezifische Aktivität der ^{3}H-B[*c*]PH-Stammlösung

Die Herstellerangaben zur spezifischen Aktivität der ^{3}H B[*c*]PH-Stammlösung wurden überprüft.

Hierzu wurde die Aktivität eines Aliquotes der Lösung im HPLC-Radiodetektor vermessen. Die vom Hersteller beschriebene Zählausbeute von 38% wurde hierbei zugrunde gelegt.

Die gemessene Aktivität 0,09 Ci/mM bestätigt im Rahmen der Meßungenauigkeit die Angaben des Herstellers.

Kennzeichnung (Amersham): 37 MBq/ml ^{3}H-B[*c*]PH-Lösung entspricht 0,104 Ci/mmol ^{3}H-B[*c*]PH.

6.6.2 Inkubation von Mikrosomen mit ^{3}H B[*c*]PH

Magnesiumchlorid-Lösung 0,3M

Kaliumphosphatpuffer 0,5M pH7,4: 0,5M K_2HPO_4-Trihydrat mit 0,5M KH_2PO_4 auf pH7,4 titrieren

Die Inkubation der Mikrosomen mit ^{3}H-B[*c*]PH wurde in einem Gesamtvolumen von 0,5ml Kaliumphosphatpuffer (50µM) durchgeführt. Unter identischen Bedingungen wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Ein Pipettierschema ist in Schema 6.4 wiedergegeben.

Der Ansatz enthält:

- ^{3}H-B[*c*]PH (5µM)
- Mikrosomensuspension 0,5mg Protein/ml
- $MgCl_2$ 3mM
- NADPH-generierendes System:
    - Glucose-6-phosphat (5mM)
    - Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (5mM)
    - NADP (1mM)

Schema 6.4 Pipettierschema der B[*c*]PH-Metabolismusstudien

Lösungen	Blindprobe	Positivprobe
Phosphatpuffer pH7,4	50µl	50µl
bidest. Wasser	Ergänzen bis 0,5ml Gesamtvolumen	
Mikrosomensuspension	7,7-61 µl (abhängig vom Proteingehalt der Proben-suspension) (2 Minuten in siedendem Wasserbad kochen)	-
$MgCl_2$-Lösung (0,3 M)	5µl	5µl
NADP-Lösung (0,05 M)	10µl	10µl
Glucose-6-phosphat (0,5M)	5µl	5µl
Mikrosomensuspension	-	7,7-61µl (abhängig vom Proteigehalt der Proben-suspension)
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Lösung (100 units/ml)	5µl	5µl
^{3}H-B[*c*]PH-Lösung 0,5mM in DMSO	5µl	5µl

Die Blindprobe enthält die durch 2-minütiges Kochen im Phosphatpuffer inaktivierten Mikrosomen. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrates (^{3}H-B[*c*]PH) gestartet. Nach dem Mischen erfolgt die Inkubation im Thermomixer über 20 Minuten bei 37°C und maximaler Rüttelgeschwindigkeit. Die Reaktion wurde anschließend sofort durch Zugabe von 0,5ml eisgekühltem Aceton abgestoppt. Die entstandenen Metabolite sowie das verbleibende Ausgangssubstrat werden mit 3X 1ml Ethylacetat extrahiert, wobei das gefällte Protein entfernt wurde. Das Lösungsmittel der vereinten organischen Phasen wurde im Stickstoffstrom entfernt.

6.6.3 Analyse der Metaboliten

Der nach 5.6.2 durch Ethylacetatextraktion erhaltene Rückstand, der die ^{3}H-markierten Metabolite enthält, wird zunächst mit 30µl Aceton aufgenommen, mit 260µl Methanol/Wasser-Gemisch sowie mit 10µl eines Standardgemisches versetzt, das die Refernzverbindungen B[*c*]PH-3,4-DH, B[*c*]PH-5,6-DH, 1-OH B[*c*]PH, 2-OH B[*c*]PH, 3-OH B[*c*]PH, 4-OH B[*c*]PH und 5-OH B[*c*]PH (je 1,5 mM in DMSO) enthält.

Nach jeder Zugabe wurde die Lösung mittels Vortex durchmischt. Von den insgesamt 300 µl Lösung wurden je 250 µl über eine 500 µl Injektionsschleife auf die HPLC gegeben. Die Auftrennung erfolgte mittels Reversed-Phase-HPLC (Methanol/Wasser-Gradient) an einer RP18-Säule nach dem in Schema 6.5 angegebenen Gradientenprogramm. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Online-Radiodetektion in Reihe geschaltet mit einem UV-Detektor. Hierbei wurden je ml Methanol/Wasser-Fließmittelgemisch 3ml Scintillationscocktail zugepumpt. Zur Identifizierung der ^{3}H-markierten Metabolite diente ein Vergleich der Peak-Retentionszeiten im ^{3}H-Spektrum mit den bei 280 nm im UV detektierten charakteristischen Spektrum der Referenzverbindungen Retentionszeitverschiebungen zwischen einzelnen Meßserien hatten daher keinen Einfluß auf die Identifizierung der Peaks.

Schema 6.5 RP-HPLC-Gradientenprogramm zur Trennung von B[*c*]PH-Metaboliten (Metanol/Wasser)

Zeit [min]	0	10	35	45	60	70	80	85
Methanol [%]	40	50	50	70	70	100	80	40

6.6.4 Korrelationen

Die Berechnung der Spearman-Korrelationskoeffizienten erfolgte rechnergestützt mit Hilfe des Statistikprogramms „Stat Most“ für Windows.
Spearman-Korrelationskoeffizienten sind ein Maß für die Abhängigkeit zweier Variablen X und Y, jeweils bei Betrachtung unabhängiger Paare (Encyclopaedia of Mathematics, 1992)

6.6.4 Inhibitorstudien

Bei Metabolismusstudien in der Gegenwart von Inhibitoren wurden die entsprechenden Inhibitormengen (in DMSO gelöst) unmittelbar vor der Mikrosomensuspension in

den Ansatz pipettiert. Alle Ansätze einschließlich der Kontrollinkubation (ohne Inhibitor) enthielten gleiche Anteile DMSO.

6.6.5 Flüssigscintillationszählung

Zur Bestimmung der Restaktivität in den verbleibenden Wasserphasen wurden diese einschließlich des gefällten Proteins aus den Epi-Caps in Zählgläserpipetiert, mit 3,4 ml Scintillationscocktail versetzt und mittels Vortex durchmischt. Die Zähldauer betrug jeweils 1min.

6.7 *umu*-Test

Die Durchführung des umu-Test erfolgte nach Shimada et al., 1994

6.7.1 Bakterienstämme

Die transfizierten Salmonella typhimurium TA 1535-Stämme pSK 1002 und NM 2009 wurden freundlicherweise von Herrn F.P. Guengerich (Nashville Tennessee) bezogen. Der Bakterienstamm NM2009 unterscheidet sich von pSK1002 durch eine zusätzliche O-Acetyltransferase-Aktivität und ist besonders empfindlich für die Detektion der Genotoxizität aromatischer Amine (Shimada et al., 1994).

6.7.2 Kultivierung der Bakterien

Luvia-Bertoni (LB)-Medium (500 ml Lösung)
-5g Bacto-Trypton (Casein)
-2,5g Bacto Yeast-Extract
-2,5g NaCl
-vor dem Auffüllen auf 500 ml mit 1N NaOH auf
-pH 7,2 einstellen

-autoklavieren

TGA-Medium

-10g Bacto-Trypton
-5g NaCl
auf 990 ml auffüllen und autoklavieren
-unter sterilen Bedingungen 10 ml einer zuvor autoklavierten 20%igen Glukoselösung zugeben

Die Kultivierung der Bakterien erfolgt unter halbsterilen Bedingungen.
Von der gefrorenen, in flüssigem Stickstoff konservierten Stammkultur wurde mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens etwas Suspension abgekratzt und in 25 ml LB-Medium suspendiert, das zuvor mit Ampicillinlösung bzw. Chloramphenikol-Lösung (50 µg/ml Ampicillin für TA 1535/pSK1002; 25 µg/ml Ampicillin; 25 µg/ml Chloramphenikol für NM 2009) versetzt wurde. Der Ansatz wurde bei 37°C unter Umschwenken (160 UPM) bei leicht geöffnetem Gefäß, 14 Stunden im Inkubator bebrütet.

6.7.3 Konservierung der Bakterien

je 0,9 ml Bakteriensuspension werden unter Zugabe von 0,1 ml DMSO in Kryoröhrchen pipettiert, der Inhalt gut durchmischt und sofort zunächst im Gefrierschrank (-20°C), dann im Biofreezer (-80°C) tiefgefroren und später unter flüssigem Stickstoff gelagert.

6.7.4 Durchführung des *umu*-Test

6.7.4.1 Herstellung der Bakteriensuspension

Die über Nacht gewachsene Bakterienkultur (siehe 5.7.2) wird in einem zuvor sterilisierten Erlenmeyerkolben 1:30 mit TGA-Medium verdünnt und ca. 90 Minuten bei 37°C und 160 UPM weiterkultiviert. Die Bakteriendichte wird bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen TGA-Medium photometrisch gemessen. Eine optimale Dichte ist

erreicht wenn die Extinktion 0,25-0,30 beträgt. Es empfiehlt sich eine Kontrollmessung ab 60 Minuten.
Um das Bakterienwachstum zu unterbrechen wurde die Suspension auf Eis gestellt.

6.7.4.2 Metabolische Aktivierung

Jeder Ansatz wurde mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Inkubation der humanen Lebermikrosomen mit dem jeweiligen Substrat erfolgt in einem Gesamtvolumen von 1 ml Lösung bestehend aus 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), einem NADPH-generierenden System (Glukose-6-phosphat (5mM), $NADP^+$ (1mM) und 0,75 IU Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, und der unter 5.7.4.1 erhaltenen Bakteriensuspension (Schema 5.6).

Schema 5.6 Pipettierschema zur Bestimmung der SOS-Induktion in S. typhimurium TA 1535 pSK 1002 durch PAK-DH nach metabolischer Aktivierung.

	Kontrolle	**Probenwert**
Phosphatpuffer 0,5M pH 7,4	100µl	
bidest. Wasser	ergänzen bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml	
Mikrosomensuspension	höchste eingesetzte Konzentration 2 min Kochen im siedenden Wasserbad	-
Glukose-6-Phosphat	10µl	
$NADP^+$	20µl	
Mikrosomensuspension		Menge je nach Konzentration
Glukose-6-Phosphat-DH	10µl	
Testsubstanz	5µl	
Bakteriensuspension	750µl	
Inkubation bei 37°C und maximaler Rüttelgeschwindigkeit für 2 Stunden		

Die Inkubation erfolgt in einem Schüttelwasserbad bei 37°C und maximaler Rüttelgeschwindigkeit für 2 Stunden. Die Kontrollinkubation enthielt durch vorheriges Kochen inaktivierte Mikrosomen (jeweils die höchste Mikrosomenkonzentration)
Je nach Problemstellung wurden Kontrollenansätze ohne Substrat oder Mikrosomen inkubiert. Zum Beenden der Inkubation werden die Ansätze auf Eis gestellt.
Ein Pipettierzyklus betrug max. 45 Minuten, 20 zeitgleiche Inkubationsansätze wurden nicht überschritten.

6.7.4.3 Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Miller, 1972
Die Induktion des umuC-lacZ-Gens wird nach Lyse der Zellmembran durch Messung der ß-Galactodidase-Aktivität bestimmt.
Aus den erhaltenen Inkubationsansätzen werden jeweils 100 ml entnommen und mit 0,9 ml Z-Puffer (vor Gebrauch 0,35ml Mercaptoethanol/ 100 ml zugeben) versetzt. Durch Zugabe von 25 µl einer 0,1%igen SDS-Lösung, 2,5 µl Chloroform und mittels Vortex wurden die Bakterien lysiert.

Lösung	**Kontrolle**	**Probe**
Bakteriensuspension aus Testsubstanzinkubation		100µl
bidest. Wasser	100µl	
Z-Puffer-Lösung	900µl	
SDS-Lösung	25µl	
Chloroform	5µl	
	Vortex	
2-NPG-Lösung	100µl	
	Vortex	
	Inkubation bei 37°C für 15 Minuten (Wasserbad)	
Na-Carbonat-Lösung	500µl	

Nach Zugabe von 100 µl O-Nitrophenyl-ß-D-Galactopyranosid (4 mg/ml in 0,1M Na-Phosphat-Puffer pH 7, frisch hergestellt) und Durchmischung mittels Vortex wurden die Ansätze im Schüttelwasserbad bei 37°C für 15 Minuten inkubiert.
Zum Beenden der Reaktion werden je Ansatz 500µl 1M Natriumcarbonat-Lösung zupipettiert und der Ansatz gevortext.
Ein Kontrollansatz, der statt der Bakteriensuspension 100 bidest. Wasser enthält, wird mitgeführt.
Die quantitative Bestimmung der Nitrophenolationen erfolgt bei einer Wellenlänge von 420 nm, die der Trübung bei 550nm gegen den unter 5.7.4.2 vorbereiteten Blindwert.
Die Bakteriendichte in den einzelnen Inkubationsansätzen wird bei 600 nm gegen TGA-Medium gemessen.

6.7.4.4 Berechnung der Induktion der Genexpression

1) bezogen auf das Volumen des Inkubationsansatzes:

$$\textit{umu}\text{-units/ml Inkubationsansatz} = \frac{1000 \times (\text{Abs}_{420} - 1{,}75\ \text{Abs}_{550})}{15\ [\text{min}] \times 0{,}1\ [\text{Verdünnung}] \times \text{Abs}_{600}}$$

2) bezogen auf die Mikrosomenmenge

$$\textit{umu}\text{-units (units/min x mg protein)} = \frac{\textit{umu}\text{-units (Probe)} - \textit{umu}\text{-units (Kontrolle)}}{[\text{min}] \times 0{,}1\ [\text{Verdünnung}] \times \text{Abs}_{600}}$$

6.7.4.5 Inhibitorstudien

Bei Metabolismusstudien in der Gegenwart von Inhibitoren wurden die entsprechenden Inhibitormengen (in DMSO gelöst) unmittelbar vor der Mikrosomensuspension in den Ansatz pipettiert. Alle Ansätze einschließlich der Kontrollinkubation (ohne Inhibitor) enthielten gleiche Anteile DMSO.

6.8 HPRT-Test

Die Durchführung des HPRT-Tests erfolgte nach Bradley et al., (1981).

6.8.1 Zellkultur

G-Medium 0,5 l DMEM-Medium mit Phenolrot
Zusätze:
50 ml fötales Kälberserum
5 ml Natriumpyruvatlösung
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung
5 ml Geneticin-Lösung

PBS-Stammlösung 5 g NaCl
0,25 g KCl
0,72 g Na_2HPO_4
0,125 g KH_2PO_4
in 1 l bidest. Wasser lösen

PBS-Lösung 50 ml Stammlösung mit bidest Wasser auf 500 ml auffüllen

Trypsinlösung 0,125 g Trypsin
0,0624 g EDTA
in 250 ml PBS-Lösung lösen (pH 7,4)

Trypanblaulösung 0,5 g Trypanblau
0,9 g NaCl
in 100 ml bidest Wasser lösen

Passagenzahl:
Für die HPRT-Mutationstests mit V79 h3A4 hOR-Zellen wurden Zellen der Passagenzahl 4 eingesetzt.

6.8.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm^3 Kulturflaschen in jeweils 15 ml N-Medium. Die Zellen wurde im Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 85% sowie einem CO_2-Gehalt von 5% bebrütet. Sofern die Zellen nicht passagiert oder inkubiert wurden, erfolgte der Mediumwechsel spätestens nach 3 Tagen. Hierbei wurde das verbrauchte Medium abgegossen, der Zell-Monolayer jeweils zweimal mit 5 ml PBS-Lösung gespült, bevor 15 ml frisches Medium zupipettiert wurden.

6.8.1.2 Auftauen und Aussaat der Zellen

Die auf -180°C gekühlte im Kryoröhrchen befindliche Zellsuspension wurde rasch bei 37°C aufgetaut und in ein mit 10 ml N-Medium gefülltes 15 ml Bluemax überführt Die suspendierten Zellen wurden sofort 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche überführt und wie unter 5.8.1.1 beschrieben bebrütet.

6.8.1.3 Passagieren der Zellen

V79-Zellen wachsen in Monolayer-Kultur und müssen daher bei konfluentem Bewuchs passagiert werden. Hierzu wurde das Medium abgegossen und der Zellmonolayer zweimal mit jeweils 5ml PBS-Lösung gespült. Anschließend wurden 2 ml Trypsinlösung auf den Monolayer aufgebracht. Nach 30 Sekunden Einwirkzeit lassen sich die Zellen durch Abklopfen der Kulturflasche vollständig ablösen. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von 5 ml N-Medium inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Hochziehen in einer 5 ml Pipette vereinzelt.

6.8.1.3 Einfrieren der Zellen

1,25 ml Zellsuspension (10^6-1,5 x 10^6 Zellen/ml) wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert, danach 150 µl DMSO zugegeben, um beim Einfrieren Kristallbildung zu vermeiden. Zuletzt wurde das Gemisch mittels Vortex homogenisiert. Die Zellsuspension wurde langsam heruntergekühlt, zunächst bei -20°C für 24 Stunden, anschließend erfolgt die dauerhafte Einlagerung im Biofreezer bei -80°C.

6.8.1.4 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst mit Trypanblau-Lösung gefärbt, wobei nur geschädigte Zellen dunkelblau gefärbt werden, während intakte Zellen ungefärbt bleiben und sich vom blauen Hintergrund abheben.

6.8.2 Bestimmung von HPRT-Vorwärtsmutationen in V79 h3A4 OR

6.8.2.1.1 Inkubation mit der Testsubstanz

0.Tag Einsaat der Zellen

Für jede Testsubstanz werden pro Konzentration je 10^6 V79 h3A4 hOR-Zellen in einer Kulturflasche kultiviert. Zum Anwachsen der Zellen wurden diese zunächst 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

1.Tag: Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz

Die Testsubstanz in DMSO wird in Bluemax mit N-Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (insgesamt 15 ml Medium). Das Kulturmedium der angewachse-

nen Zellen wird abgegossen und der Zellmonolayer 24 Stunden mit Testsubstanz-haltigem N-Medium inkubiert.

2.Tag: Inkubationsstop und Passage

Nach 24h Inkubationszeit wurde das Testmedium durch N-Medium ersetzt. Die Zellen werden passagiert, die Gesamtanzahl der Zellen in der Flasche bestimmt und je Konzentration 10^6 Zellen in neuen Kulturflaschen ausgesät. Sofern durch betrachten des Monolayers unter dem Mikrosokop eine Zellzahl < 10^6 zu erwarten war, wurde die Passage erst nach weiteren 24 Stunden durchgeführt und lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.Tag: Passage

Die Zellzahl in den Flaschen wird bestimmt und jeweils 10^6 Zellen in neuen Zellkulturflaschen weiterkultiviert.

6.8.2.2 Selektion der HPRT-Mutanten

Selektionsmedium
- -500ml DMEM
- -25 ml FKS
- -5 ml Na-Pyruvat-Lösung
- -5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
- -0,5 ml Thioguanin-Stammlösung

Thioguanin-Stammlösung: 9 mg 6-Thioguanin in 1ml DMSO gelöst
Kochsalzlösung (0,9%)
Methylenblaulösung (0,5% in Ethanol)

6.Tag Passage, Kultivierung in Selektionsmedium und Bestimmung der Cloning-Efficiency

Die Zellen werden passagiert. Je Konzentration werden 3 Flaschen mit jeweils 10^6 Zellen in Selektionsmedium (TG-Medium) kultiviert. Parallel wird die Cloning Effi-

ciency bei jeder Testsubstanzkonzentration bestimmt um zytotoxische Effekte erfassen zu können. Hierzu werden jeweils 200 Zellen in Petrischalen in N-Medium kultiviert.

13-16.Tag Färbung der Kolonien

Die Färbung der gebildeten Kolonien erfolgte zwischen dem 13. und dem 16. Tag nachdem die Zellkolonien in den Kulturflaschen sowie in den Petrischalen bereits mit blosem Auge sichtbar wurden.
Hierzu wurde das Kulturmedium abgegossen, zweimal mit Kochsalzlösung gespült und die Kolonien mit 5 ml Ethanol (-18°C) fixiert. Für die Färbung läßt man Methylenblaulösung (-18°C) 30 Minuten auf die fixierten Kolonien einwirken. Danach wurde der Farbstoff abgegossen, die gefärbten Kolonien mit Leitungswasser gewaschen und nach dem Trocknen ausgezählt.

6.8.2.3 Auswertung

Die je Testsubstanzkonzentration erhaltenen Koloniezahlen im Selektionsmedium sowie die ausgezählten Kolonien der CE werden gemittelt.
Aus der CE wird ein Korrekturfaktor (F) berechnet.

$$\text{Korrekturfaktor (F)} = \frac{200\ ^{a)}}{\text{Mittelwert CE}}$$

a) Anzahl der ausgestreuten Zellen

Die Mutationsfrequenz (MF) je 10^6 Zellen für eine Testsubstanzkonzentration ergibt sich durch Multiplikation der Anzahl an Mutantenkolonien mit dem Korrekturfaktor (F). Von den einzelnen Mutationsfrequenzen wird die Spontanmutationsfrequenz (MF_0) in der Kontrolle (Lösungsmittel) abgezogen, was als ΔMF (δ-Mutationsfrequenz) bezeichnet wird. Nach Bradley et al. (1981) kann von einem

Mutagen gesprochen werden wenn die MF der Testsubstanz um Faktor 3 größer ist als MF_0.

7 Literatur

Agarwal R., Canella K.A., Yagi H., Jerina D.M. and Dipple (1996) 1); Benzo[c]phenanthrene-DNA-adducts in mouse epidermis in relation to the tumorigenicities of four configurationally isomeric 3,4-dihydrodiol 1,2-epoxides; Chem. Res. Toxicol; 9: 586-592

Agarwal R., Yagi H., Jerina D.M., Dipple A.; (1996) 2) Benzo[*c*]phenanthrene 3,4-dihydrodiol 1,2-epoxide adducts in native and denaturated DNA; Carcinogenesis 17: 1773-1776,

Ames, B.N (1979): Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer; Science; 204: 587-593

Amin S., Desai D., Hecht S.S.; (1993) Tumor-initiating activity on mouse skin of bay region diol-epoxides of 5,6-dimethylchrysene and benzo(c)phenanthrene; Carcinogenesis; 14: 2033-2037

Amin S., Desai D., Dai W., Harvey R.G.und Hecht S.S. (1995) 1), Tumorigenicity in newborn mice of fjord region and other sterically hindered diol epoxides of benzo[g]chrysene, dibenzo[a,l]pyrene (dibenzo[*def,p*]chrysene), 4H-cyclopenta[*def*]chrysene and fluoranthene

Amin S., Krzeminski J., Rivenson A., Kurtzke C., Hecht S.S., El- Bayoumy K. (1995) 2); Mammary carcinogenicity in female CD rats of fjord region diol epoxides of benzo(c)phenanthrene, benzo(g)chrysene and dibenzo(a,l)pyrene,

Angerer J., Gündel J., Mannschreck C., Ewers U., Büttner K. (1997) 1) Beurteilung der PAH-Belastung Anwohner eines Industriegebietes in der Bundesrepublik Deutschland; Umweltmed. Forsch. Prax.; 2: 17-22

Angerer J. , Mannschreck C., Gündel J. (1997) 2); Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene; Int. Arch. Occup. Environ. Health; 69: 323-331

Anttila, S., Vainio, H., Hietanen, E., Camus, A. M., Malaveille, C., Brun, G., Husgafvel-Pursiainen, K., Heikkila, L., Karjalainen, A., and Bartsch, H. (1992), Immunohistochemical detection of pulmonary cytochrome P450 IA and metabolic activities associated with P450 IAI and P450 IA2 isoenzymes in lung cancer patients. Environ. Health Perspect., 98: 179-182

Arif J.M., Gupta R.C. (1997); Microsome-mediated bioactivation of dibenzo[*a,l*]pyrene and identification of DNA adducts by ^{32}P-postlabelling; Carcinogenesis 18: 1999-2007

Ashby J. (1995); Druckrey's definition of genotoxic; Mut. Res. 329: 225

Badger G.M., Cook J.W., Hewett C.L., Kennaway E,L., Kennaway N.M., Martin R.H., Robinson A.M. (1940); The production of cancer by pure hydrocarbons; Proc. of the Royal Society of London 129: 439-467

Bartsch H., Petruzzelli S., De Flora S., Hietanen E., Camus A.-M., Castegnaro M., Alexandrov K., Rojas M., Saracci R., Giuntini C., (1992); Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case-control multicenter study on lung cancer patients; Env. Health Persp.; 98: 119-124

Bartsch H., Rojas M., Alexandrov K., Camus A.-M., Castegnaro M., Malaveille C., Anttila S., Hirvonen K., Husgafvel-Pursiainen K., Hietanen E., Vainio H. (1995); Metabolic polymorphism affecting DNA binding and excretion of carcinogens in humans; Pharmacogenetics; 5: 84-90

Bauer E., Guo, Z., Ueng, Y.F., Bell L.C., Zeldin D., Guengerich F.P. (1995); Oxidation of benzo[*a*]pyrene by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes; Chem. Res. Toxicol.; 8: 136-142

Beaune, P., Kremers, P.G., Kaminsky, L.S., de Graeve, J., and Guengerich F.P. (1986) Comparison of monooxygenase activities and Cytochrome P-450 isoenzyme concentrations in human liver microsomes, Drug metab. Dispos., 14: 437-442

Bingham, E. und Falk, H.L. (1969); Environmental carcinogens. The modifying effect of cocarcinogens on the threshold response; Arch. Environ. Health; 19: 779-783

Bradley M.O., Bhuyan B., Francis M.C., 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. 31: 81-142

Brian W.R., Sari M.A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L.S., und Guengerich F,P.(1990); Catalytic activities of human liver Cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae;* Biochemistry, 29: 11280-11292

Bridbord, K. und French, J.G. (1978), Carcinogenic and mutagenic risks associated with fossil fuels; Jones, P.W. und Freudenthal, R.I., (Hrsg.), Carcinogenesis, Vol.3 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, New York, Raven Press 451-463

Burke, M.D., Thomson S., Elcombe, C., Hulpert C.E., Haaparanta T., Mayer, R.T. (1985); Ethoxy-, Pentoxy- and Benzyloxyphenoxazones and homologues: A series of substrates to distiguish between different induced Cytochromes p-450; Biochem. Pharmacol.; 34: 3337-3345

Butler, M.A., Iwasaki, M., Guengerich F.P., Kadlubar F.F. (1989); Human cytochrome P-450$_{PA}$ (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 86: 7696-7700

Buening, M.K.; Fortner J.G.; Kappas J.G.; Conney A.H. (1978); 7,8-Benzoflavone stimulates the metabolic activation of aflatoxine B1 to mutagens by human liver; Biochem Biophys Res. Comm. 82: 348-355

Buening M.K.; Chang R.L.; Huang M.R.; Fortner J.G.; Wood A.W.; Conney A.H.; (1981); Activation and Inhibition of benzo[a]pyrene and aflatoxin B1 metabolism by in human liver microsomes by naturally occuring flavonoids; Cancer Res; 41: 67-72

Canella K.A., Peltonen K., Yagi H., Jerina D.M., Dipple A. (1992), Identification of individual Benzo(c)phenanthrene Dihydrodiol Epoxide-DNA Adducts by the ^{32}P-Postlabelling Assay; Chem. Res. Toxicol., 5: 685-690

Cavalieri, E., Wong A., Rogan E.(1987); Evidence for distinct binding sites in the cumene hydroperoxide-dependent metabolism of Benzo[a]pyrene catalyzed by Cytochrome P-450; Biochemical Pharmacology, 36: 435-440

Cavalieri,,E.L., Rogan E.G., Higginbotham, S., Cremonesi, P., und Salmasi, S. (1989) Tumor-initiating activity in mouse skin and carcinogenicity in rat mammary gland of dibenzo[*a*]pyrenes: The very potent environmental carcinogen dibenzo[*a,l*]pyrene; J. Cancer Res. Clin. Oncol.; 115: 67-72

Cavalieri E.L., Higginbotham S., Rama Krishna N.V.S., Devanesan P.D., Todorovic R., Rogan E.G., 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

Chang T.K.H., Gonzalez F.J., Waxman D.J. (1994); Evaluation of Triacetyloleandomycin, α-Naphthoflavone and Diethyldithiocarbamate as Selective Chemical Probes for Inhibition of Human Cytochromes P450; Arch. Bioch. Biophys.; 311: 437-442

Council of Europe (1992) 1); Health aspects of using smoke flavours as food ingrediants; Council of Europe Publishing; Strasbourg,

Council of Europe (1992) 2); Council of Europe guidelines concerning the transmission of flavour of smoke to food; Council of Europe Publishing; Strasbourg,

Cresteil, T. (1998), Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications; Food Add. Contam., 15: Suppl. 45-51

Day B.W., Sahali Y., Hutchins D.A., Wildschütte M., Pastorelli, R., Nguyen T.T., Naylor S., Skipper, P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S,R. (1992); Fluoranthene metabolism: Human and Rat Liver Microsomes Display Different stereoselective Formation of the trans-2,3-Dihydrodiol; Chem. Res. Toxicol.; 5: 779-786

DeVos R.H., Dokkum van W., Schouten A., Jong-Berkhout de P.(1990) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Dutch total diet samples (1984-1986) Fd. Chem. Toxic. 28: 263-268

Duuren van, B.L., (1958) The polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate; J. natl Cancer Institute, 21: 623-630

Dannan, G.A., Guengerich F.P., Kaminsky, L.S. und Aust S.D., (1983); Regulation of Cytochrome P-450; Immunochemical quantitation of eight isoenzymes in liver microsomes of rats treated with polybrominated biphenyl congeners; J. Biol. Chem. 258: 1282-1288

Distlerath, L.M. and Guengerich, F.P., (1987), Enzymology of human liver cytochromes P-450, in: mammalian Cytochromes P-450, Vol 1 (F.P. Guengerich Hrsg.); CRC Press; Boca Raton; FL; 133-198

Doehmer, J., Seidel A., Oesch, F., Glatt, H. (1990); Genetically engineered V79 Chinese Hamster cells metabolically activate the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide; Env. Health Persp.; 88: 63-65

Doehmer J.; Jacob J. (1994); Gentechnologisch konstruierte V79 Zellinien in Kombination mit chemisch analytischen Verfahren als Ersatz und Ergänzung zu Tierversuchen (1994); ALTEX; 11: 141-147

Einolf H.J., Amin S., Yagi H., Jerina D., Baird W.M. (1996); Benzo(c)phenanthrene is activated to DNA-binding diol epoxides in the human mammary carcinoma cell line MCF-7 but only limited ativation occurs in mouse skin; Carcinogenesis; 17: 2237-2244;

Einolf H.J., Story W.T., Marcus C.B., Larsen M.C., Jefcoate C.R., Greenlee W.F., Yagi H., Jerina D.M., Amin S., Park S.S., Gelboin H.V., Baird W.M. (1997); Role of cytochrome P450 Enzyme induction in the metabolic activation of benzo[*c*]phenanthrene in human cell lines and mouse epidermis; Chem Res. Toxicol.; 10: 609-617

Eisenbrand G., Metzler M. (1994), Toxikologie für Chemiker;Thieme Verlag; Stuttgart, New York; 1994

Ernährungsbericht 1996; Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) Frankfurt a.M. (1996)

Encyclopedia of mathematics; Vol 8, London, 1992

Fábian, B. (1968); Carcinogenic substances in cooking fat and oil; IV. Studies on margarine, vegetable fat and butter; Arch. Hyg. Bakt.; 152: 231-237

Fretheim K., (1976); Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian smoked meat sausages; J. Agric. Food Chem.; 24: 976-979

Friedel A. (1997); Quantifizierung und Beeinflussung der humanen Cytochrom P450 3A4-Enzymaktivität in gentechnisch veränderten V 79-Zellen; Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Gillam E. M. J., Guo Z., Ueng Y.-F., Yamazaki H., Cock, I, Reilly P.E.B., Hooper W.D.; Guengerich F.P. (1995); Expression of Cytochrome P450 3A5 in Escherichia coli: Effects of 5' Modification, Purification, Spectral Characterization, Reconstitution Conditions, and Catalytic Activities; Arch. Bioch. Bioph. 317

Glatt H., Gemperlein I.; (1987); Search for cell culture systems with diverse Xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies, Molecular Toxicology, 313-334

Glatt H., (1993); HPRT-Genmutationstest in V79 Zellen des chinesischen Hamsters; in Fahrig R. (Hrsg.); Mutationsforschung und genetische Toxikologie, S. 243-262, Wissenschaftliche Buchgesellschaft.

Gomaa E.A., Gray J I., Rabie S., Lopez-Bote C., Booren A.M. (1993); Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings; Food Add. Contam. 10: 503-521

Göen Th., Gündel J., Schaller K.H., Angerer J. (1995); The elimination of 1-hydroxypyrene in the urine of the general population and workers with different occupational exposures to PAH; The Science of the Total Environment; 163: 195-201

Grimmer G., Böhnke H., Glaser A. (1977); Investigation on the carcinogenic burden by air pollution in man XV. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Automobile Exhaust Gas- An Inventory; Zbl. Bakt. Hyg., Orig. B 164: 218-234

Grimmer G., Schneider, D. und Dettbarn, G. (1981) The load of different rivers in the Federal Republic of Germany by PAH (PAH-profiles of surface water), Wasser, 56: 131-144

Guengerich, F.P., Danna G.A., Wright, S.T., Martin M.V. und Kaminsky, L.S. (1982); Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical propeties and inducibility of eight isoenzymes isolated from rats treated with phenobarbital or α-naphthoflavone; Biochemistry, 21: 6019-6030

Guengerich F.P. (1989); Characterization of human microsomal cytochrome P450-enzymes; Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.; 29: 241-264

Guengerich F.P (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human Cytochrome P450-enzymes. Chem Res. Toxicol., 4: 391-407, 1991

Guengerich F.P. (1995)**;** Analysis and characterization of enzymes In: Hayes A.W. (Hrsg.), Principles and Methods of Toxicology, Ed. 3, pp. 1259-1313

Guengerich F.P. (1995); Human cytochrome P450s. In: Ortiz de Montellano (Hrsg.) Cytochrome P450, New York: Plenum Publishing Corp.; 473-535

Guengerich F.P., Gillam E.M.J., Shimada T. (1996) 1); New applications of bacterial systems to problems in toxicology; Crit. Rev. Toxicol; 26: 551-583

Guengerich F.P. (1996) 2); Metabolic Control of Carcinogenesis; in: Control Mechanisms of Carcinogenesis; Hengstler J.G.; Oesch F. (Hrsg.); Mainz; 1996

Gündel J., Mannschreck C., Büttner K., Ewers U., Angerer J. (1996); Urinary Levels of 1-Hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-Hydroxyphenanthrene in Females Living in an Industrial Area of Germany; Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 585-590 (1996)

Guo, Z., Gillam E.M.J., Ohmori, S., Tukey, R.H., und Guengerich, F.P. (1994); Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in Escherichia coli: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties; Arch Biochem. Biophys.; 312: 436

Hakkola J., Pasanen M., Pelkonen O., Hukkanen j., Evisalmi S., Anttila S., Rane A., Mäntylä M., Purkunen R., Saarikoski; Tooming M., Raunio H. (1997), Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP 1B1 and CYP 1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells Carcinogenesis; 18: 391-397

Hammons, G.J., Milton D., Stepps K., Guengerich F.P., Tukey R.H., und Kadlubar F.F. (1997); Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes; Carcinogenesis 18: 851-854

Harris, C.C., Autrup, H., Connor R., Barnett, L.A., Mc Dowell, E.M. and Trump B.F. (1976) Interindividual variation in binding of benzo[a]pyrene to DNA in cultured human bronchi.; Science (Washington DC) 194: 1067-1069

Harris C.C. (1991); Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990s; Cancer Res. (Suppl.) 51: 5023-5044

Harvey, R., G., (1995), Synthesis of the dihydrodiol and diol epoxide metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. in: R.G. Harvey (Hrsg.), Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis, pp. 35-62. American Chemical Society Symposium Series No. 283. Washington, D.C.: American Chemical Society

Hecht S.S., Amin S., Lin J-M., Rivenson A., Kurtzke C. und El-Bayoumy, K., (1995); Mammary carcinogenicity in female CD rats of a diol epoxide metabolite of fluoranthene, a commonly occuring environmental pollutant; Carcinogenesis; 16: 1433-1435

Hecht S.S., El-Bayoumy K., Rivenson A., Amin S.; (1994) Potent mammary carcinogenicity in female CD Rats of a Fjord Region Diol-Epoxide of Benzo(c)phenanthrene compared to a Bay region diol-epoxide of Benzo(a)pyrene; Cancer Research 54: 21-24;

Hecht S.S., Grabowski, W., Groth K.(1979); Analysis of Faeces for Benzo[a]pyrene after consumption of charcoal-broiled beef by rats and humans; Fd. Cosmet Toxicol. 17: 223-227

Hecht S.S., La Voie, E., Amin, S., bedenko, V., und Hoffmann, D., (1980) On the metabolic activation of the benzofluoranthenes. In: Bjorseth, A. und Dennis A.J., eds, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Chemistry and Biological Effects, 4th Symposium, Columbus, OH, Battelle Press, 41417-433

Hecht S.S., Rivenson A., Amin S., Krzeminski J., El-Bayoumy K., Reddy B. S., Kurtzke C., La Voie; (1996) Mammary carcinogenicity of diol epoxide metabolites of benzo[j]fluoranthene in female CD rats; Cancer Letters 106: 251-255

Hermann, M.; Durand J. P., Charpentier, J-M., Chaude, O., Hofnung, M., Pétroff, N., Vandercasteele, J.P.und Weill, N., (1980); Correlations of mutagenic activity with polynuclear aromatic hydrocarbon content of various mineral oils. In Bjorseth, A. und Dennis A.J. (Hrsg.); Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Biological Effects; 4th Int. Symposium, Columbus, OH, Battelle Press; 899-916

Higginbotham S., RamaKrishna N.V.S., Johansson S.L., Rogan E.G., Cavalieri E.L. (1993); Tumor-initiating activity and carcinogenicity of dibenzo[a,l]pyrene versus 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and benzo[a]pyrene at low doses in mouse skin; Carcinogenesis; 14: 875-878

IARC Monographs (1983) On The Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 32

IARC Monographs (1984) On the Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans 34

Ioannides C. und Parke D.V. (1993), Induction of cytochrome P450 1A as an indictor of potential chemical carcinogenesis; Drug metab. Rev.,25: 485-501

Iribarne, C., Berthou F., Baird S., Dréano Y, Picart D., Bail J.P., Beaune, P., Ménez, J.F. (1996); Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in Human Liver Microsomes; Chem Res. Tox., 9: 365-373

Ittah, Y., Thakker, D.R., Levin, W., Croisy-Delcey, M., Ryan D.E., Thomas P.E., Conney A.H., Jerina D.M.; (1983); Metabolism of benzo[*c*]phenanthrene by rat liver microsomes and by a purified monooxygenase system reconstituted with different isoenzymes of Cytochrome P-450 Chem. Biol. Interact., 45:15-28

Johansson, I., Lundquist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F., and Ingelman-Sundberg, M., (1993), Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine, Proc. Natl. Sci. USA 90: 11825-11829

Jones J.P., Shou M., and Korzekwa K.R. (1995); Stereospecific activation of the procarcinogen benzo(a)pyrene: a probe for the active sites of the cytochrome P450 superfamily. Biochemistry 34: 6596-6961

Kitada M., Taneda, M., Ohta, K., Nagashima, K., Itahashi, K., und Kamataki, T. (1990) Metabolic activation of aflatoxin B_1 and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by human adult and fetal livers; Cancer Res; 50: 2641-2645

Kamisky, L.S., und Fasco, M.J., 1992, Small intestinal cytochromes P450, Crit Rev. Toxicol.; 21: 407-422

Karl H., Leinemann M.; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fishery products from different smoking kilns (1996); Z Lebensm Unters Forsch; 202: 458-464

Köhl W. , Amin S, Staretz M. E., Ueng Y. F., Yamazaki H., Tateishi T., Guengerich F.P., Hecht S.S. (1996) 1); Metabolism of 5-methylchrysene and 6-methylchrysene by Human Hepatic and Pulmonary Cytochrome P450 Enzymes; Cancer Research; 56: 316-324

Köhl W. , Amin S., Yamazaki H., Ueng Y.F., Tateishi T., Guengerich F.P. Hecht S.S. (1996) 2); Metabolic Activation of chrysene by human hepatic and pulmonary cytochrome P450 Enzymes; in: Polycyclic Aromatic Compounds; 10: 59-66

Köhl W., Fischer H., Amin S., Guengerich F.P. und Hecht S.S. (1996) 3); Activation of dihydrodiols of methylchrysenes to genotoxic metabolites by human cytochrome p450-enzymes: Proceedings 87th AACR-Meeting 1996 Abstract No. 919

La Voie E.; Bedenko, V., Hirota N.; Hecht S.S.; und Hoffmann D.(1979); A comparison of the mutagenicity, tumor-initiating activity and complete carcinogenicity of polynuclear aromatic hydrocarbons, in Jones P.W. und Leber, P.; (Hrsg.); Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Ann Arbor Science Publishers; 705-721

LaVoie, E.J., Hecht, S.S., Bedenko, V., und Hoffmann, D. (1982); Identification of the mutagenic metabolites of fluoranthene, 2-methylfluoranthene and 3-methylfluoranthene; Carcinogenesis; 3:841-846

La Voie, E.J., Rice J.E., Wu Y., Weyand E,H.(1991); On the metabolic activation of benzo[j]fluoranthene; In: Polycyclic aromatic Compounds; Proceedings of the thirteenth internationalsymposium on polynuclear aromatic hydrocarbons; Garrigues P., Lamotte M. (Hrsg)

Levin W., Wood, A. W., Chang R. L., Ittah, Y., Croisy-Delcay M., Yagi H., Jerina D. M., Conney A.H.; (1980); Exceptionally high tumor-initiating activity of Benzo(c)phenanthrene bay-region diol-epoxides on mouse skin, Cancer Res., 40: 3910-3914

Levin W.; Wood A., Chang R., Ryan D., Thomas P; Yagi H., Thakker D., Vyas K., Boyd C., Chu S-Y.; Conney A., Jerina D. (1982); Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens; Drug Metab. Rev.; 13: 555-580

Levin W., Chang R.L., Wood A.W., Thakker D.R., Yagi H., Jerina D.M., Conney A.H., (1986) Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3,4-diol-1,2-epoxides of Benzo(c)phenanthrene in Murine Tumor Models; Cancer Research 46: 2257-2261

Li K.-M., Todorovic R., Rogan E.G., Cavalieri E.L., Ariese F., Suh M., Jankowiak R., und Small G.J. (1995); Identification and quantitation of Dibenzo[*a,l*]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes *in Vitro*: Preponderance of depurinating adducts, Biochemistry, 34: 8043-8049

Likhachev A.J., Beniashvili, D.S., Bycov V.J., Dukunn P.P., Tyndyk M.L., Savochkina I.V., Yermilov, V.B. und Zabezhinski M.A.; Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents: Excretion and carcinogenic risk of Benz[*a*]pyrene metabolites; Env. Health Perspect.; 98: 211-214

Lodovici M., Dolara P., Casalini C., Ciappellano S.und Testolini G. (1995), Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet; Food Add. Contam. 12: 703-713

Luch A, Platt K.L. (1996); Metabolism, DNA-Interaction and Mutagenesis: Fundamental Events in Carcinogenesis ba Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; in: Hengstler J.G.; Oesch F. (Hrsg.); Mainz; 1996

Lutz W.K. (1990); Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis; Mut. Res. 238: 287-295

Maga J.A. (1986), Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) composition of mesquite (Prosopis fuliflora) Smoke and Grilled Beef; J. Agric. Food Chem; 34: 259-251

Maier H.G. (1991); Zum Gehalt an Karzinogenen in Bohnenkaffee; Deutsche Lebensmittel Rundschau 87: 69-75

Marnett L.J.; Kennedy T.A. (1995); Comparison of the peroxidase activity of hemoproteins and cytochrom p450; in: Cytochrome P450; Ortiz de Montellano P.R. (Hrsg.) Plenum press, New York

Marquardt H. und Schäfer S.G. (1997), Lehrbuch der Toxikologie, Heidelberg, Berlin

Masuda Y., Kuratsune M. (1971); Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish; „Katsuobushi"; Gann; 62: 27-30

McManus M.E., Burgess W.M., Veronese M.E., Huggett A., Quattrochi L.C., Tukey R.H. (1990); Metabolism of 2-Acetylaminofluorene and Benzo(a)pyrene and activation of food derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450 Cancer Res. 50: 3367-3376

Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular genetics; Cold Spring Harbour Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY; 352-355

Mumford J.L., Lee X., Lewtas J., Young T.L., Santella R.M. (1993); DNA adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues from xuan wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality; Env. Health Perspect. 99: 83-87

Mushtaq M., Yang S.K. (1987), Stereoselective metabolism of benzo(c)-phenanthrene to the procarcinogenic *trans*-3,4-dihydrodiol, Carcinogenesis 8: 705-709,

Nakamura S., Oda Y., Shimada T., Oki I., Sugimoto K.(1987); SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in Salmonella typhimurium TA 1535 pSK 1002: examination with 151 chemicals; Mutation Research 192: 239-246

Nebert D.W. (1987), Gonzalez F.J.; P450 Genes: Structure, evolution, and regulation; Ann. Rev. Biochem: 56: 945-93

Nedelcheva V., Gut I (1994)**;** P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specifities and relevance to cancer; Xenobiotica; 24: 1151-1175

Oda Y., Nakamura S.; Oki **I.**, Kato T., Shinagawa H. (1985); Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens; Mutation Reserach; 147: 219-229

Omura T; Sato R.(1964); The carbon monoxide-binding pigment of liver-microsomes 1. evidenvce for its hemoprotein nature; J. Biol. Chem. 239: 2370-2378

Omura T.; Sato R. (1964); The carbon monoxide-binding pigment of liver-microsomes. 2. solubilization, purification and properties; J. Biol. Chem; 239: 2379-2385

Pruess-Schwartz, Baird W.M., Yagi H., Jerina D.M., Pigott M.A., Dipple A. (1987), Stereochemical specificity in the metabolic activation of benzo(c)phenanthrene to metabolites that Bind to DNA in Rodent Embryo Cell Cultures; Cancer Res. 47: 4032-4037

Ralston S.L., Lau H. H. S., Seidel A., Luch A., Platt K. L., Baird W. M. (1994); The potent carcinogen Dibenzo[a,l]pyrene is metabolically activated to fjord-region 11,12-Diol 13,14-epoxides in human mammary carcinoma MCF-7 cell cultures; Cancer Res.; 54: 887-890

Ralston S.L., Seidel A., Luch A., Platt K-L, Baird W.M. (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 human mammary carcinoma cell line MCF-7; Carcinogenesis; 16: 2899-2907

Ralston, S.L., Coffing S.L., Seidel A., Luch A., Platt K. L., Baird W. M. (1997); Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene and its *trans*-11,12-dihydrodiol to fjord region 11,12-Diol 13,14-epoxides in a human mammary carcinoma MCF-7 cell-mediated V79 cell mutation assay; Chem. Res. Toxicol.; 10: 687-693

Rendic S., Di Carlo, F.J. (1997); Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors; Drug Metab. Rev. 29: 413-580,

Rice J.E., Hosted T.J., Lavoie E.J. (1984); Fluoranthene and pyrene enhance Benzo[*a*]pyrene-DNA Adduct Formation *in vivo* in Mouse Skin; Cancer Letters 24: 327-333

Rice J.E., Weyand N.G., Geddie, M.C., De Floria M.C., La Voie E.J., (1987), Identification of tumorigenic metabolites of benzo[*j*]fluoranthene formed in vivo in mouse skin; Cancer Res. 47: 6166-6170

Roberts-Thomson S. J., Mc Manus M.E., Tukey R.H., Gonzalez F. F., Holder G. M. (1993); The catalytic activity of four expressed human Cytochrome P450s towards Benzo[*a*]pyrene and the isomers of its proximate carcinogen; Biochem. Biophys. Res. Comm. 192: 1373-1379

Römpp Chemie-Lexikon; J. Falbe u, M. Regitz (1995) 9. erweiterte und neubearbeitete Auflage; G. Thieme Verlag, Stuttgart

Rojas M., Camus A.M., Alexandrov K., Husgafvel-Pursiainen K., Anttila S., Vainio H., and Bartsch H. (1992), Stereoselective metabolism of (-)benzo[a]pyrene-7,8-diol by human lung microsomes and peripheral blood lymphocytes: effect of smoking Carcinogenesis; 13: 929-933

Rowlands J.C., Gustafsson J.A. (1997); Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction; Crit. Rev. Toxic.; 27: 109-134

Römpp Chemie Lexikon Falbe J., Regitz M.,Hrsg. (1995), Thieme, Stuttgart New York

Schneider, A, Schmalix W., Siruguri V., Groene de E.M., Horbach G.J., Kleingeist B., Lang, D, Böcker R., Belloc C., Beaune P., Greim H., Doehmer J. (1996); Stable expression of human cytochrome P450 3A4 in conjunction with human NADPH-Cytochrome P450 oxidoreductase in V79 chinese hamster cells. Arch. Bioch. Biophys., 332: 295-304

Schoene B., Fleischmann, R., Remmer H., and van Olderhausen, H.F. (1972) Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. Eur J. Clin Pharmacol, 4: 65-73,

Schweikl H., Taylor J.A., Kitareewan, S., Linko P., Nagorney, D.und Goldstein J.A. (1993); Expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 genes in human liver, Pharmacogenetics; 3: 239-249

Seidel A., Soballa, V.J., Raab G., Frank H., Greim H., Grimmer G., Jakob, J. Doehmer J. (1998) Regio- and stereoselectivity in the metabolism of benzo(c)phenanthrene mediated by genetically engineered V79 Chinese hamster cells expressing human cytochromes P450, Environmental Toxicology and Pharmacology 5 179-196,

Seidel A., Luch A., Platt K.L., Oesch F., und Glatt H. (1994); Activated Fjord-Region Metabolites of Dibenzo(a,l)pyrene: Synthesis and Mutagenic Activities of the Diastereomeric *syn*- and *anti*-11,12-Dihydrodiol 13,14-Epoxides; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; 6: 191-198

Shimada, T., Martin M.V., Pruess-Schwartz, D., Marnett, L.J., and Guengerich, F.P.(1989); Roles of individual human cytochrome P450-enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivates of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cancer Res. 49: 6304-6312,

Shimada, T., Guengerich F.P.(1991) Activation of amino-α-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome p450-enzymes in rat and human liver-microsomes. Cancer Res. 51: 5284-5291

Shimada T., Yun, C-H., Yamazaki, H., Gautier, J-C., Beaune, P.H., and Guengerich, F.P. (1992), Characterization of human lung microsomal Cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens, Mol. Pharmacol.; 41: 856-864

Shimada T., Gillam M.J., Sandhu P., Guo Z., Tukey R.H., Guengerich F.P.(1994) 1); Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes expressed in *Escherichia coli.* Simplified bacterial systems for genotoxicity assays; Carcinogenesis 15: 2523-2529

Shimada T., Iwasaki M., Martin M. V., and Guengerich F. P. (1994) 2); Human liver microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in Salmonella typhimurium TA 1535/pSK1002 Cancer Res.; 49: 3218-3228

Shimada T., Oda Y., Yamazaki H., Mayumi M., Guengerich F.P.;(1994) 3); SOS Function Tests for Studies of Chemical Carcinogenesis using Salmonella typhimurium TA 1535/pSK 1002, NM 2009, and NM3009; Methods in Molecular Genetics, 5: 342-354

Shimada, T., und Nakaure S. (1996) 1), Cytochrome P450-mediated activation of procarcinogens and promutagens of DNA-damaging products by measuring expression of umu-gene in Salmonella typhimurium TA 1535/pSK1002, Biochem. Pharmacol., 36: 1979-1987

Shimada T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P., Sutter T.R. (1996) 2), Activation of Chemically Diverse procarcinogens by Human Cytochrome P-450 1B1; Cancer Res. 56: 2979-2984

Shimada T., Gillam E.M.J., Sutter T.R., Strickland P.T., Guengerich F.P. and Yamazaki H., (1997); Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1 Drug Metab. Dispos. 29: 617-622

Schoene B., Fleischmann R.A., Remmer H. (1972); Determination of Drug Metabolizing Enzymes in Needle Biopsies of Human Liver; Eur J. Clin Pharmacol.; 4: 65-73

Shou, M., Korzekwa, K. R., Crespi, C. L., Gonzalez, F.J., and Gelboin H. V. (1994), The role of 12 cDNA-expressed human, rodent, and rabbit cytochromes P450 in the metabolism of benzo(a)pyrene 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene Mol. Carcinog., 10: 159-168

Shou, M., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V. (1996) 1); Stereoselective Epoxidation and Hydration at the K-Region of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by cDNA-expressed Cytochromes P450 1A1, 1A2, and Epoxide Hydrolase; Biochemistry; 35: 15807-15813

Shou, M., Grogan J., Mancewicz J.A., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., Gelboin H.V., and Korzekwa, K.R. (1996) 2) Activation of CYP 3A4: evidence for the simoultaneous binding of the two substrates in a cytochrome P450 active site. Biochemistry; 33: 6450-6455

Snook M.E., Severson R.F., Arrendale H.C., Higman H.C., Chortyk O.T. (1977); The Identification of High Molecular Weight Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in a Biologically Active Fraction of Cigarette Smoke Condensate; Beitr. z. Tabakforsch.; 9: 79-101

Soucek P., Gut I (1992); Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms; Xenobiotica; 22: 83-103

Speer K., Horstmann P., Steeg E., Kühn T., Montag A.(1990), Zur Analytik von Polycyclen in Gemüseproben Z. Lebensm Unters Forsch; 191: 442-448

Staretz M.E., Sharon M.E., Patten C.J., Nunes M.G., Köhl W., Amin S., Leemann A., König A., Guengerich F.P., Hecht S.S. (1997) Comparative Metabolism of the Tobacco related Carcinogens Benzo[a]pyrene, 4-Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanone, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanol, and N'-Nitrosonornicotine in human hepatic Microsomes; Drug Metab. Dispos.; 25: 154-162

Stryer, L. (1990); Biochemie; Verlag Spektrum d. Wissenschaft; Heidelberg

Thilly, W. G.; De Luca, J.G.; Furth, E. E.; Hoppe, H., Kaden, D. A., Krolewski, J. J.; Liber, H. L., Skopek, T. R., Slapikoff, S. A., Tizard, R. J., und Penman, B. W. (1980); Gene-locus mutation assays in diploid human lymphoblast lines in: de Serres, F.J. und Hollaender, A. (Hrsg.) Chemical Mutagens. Principles and methods for Their Detection, Vol 6; new York Plenum Press; 331-364

Tiano H. F., Wang R.L., Hosokawa M., Crespi C., Tindall K.R., Langenbach R. (1994); Human CYP 2A6 activation of 4-(methylnitroso-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK): mutational specificity in the gpt gene of AS52 cells; Carcinogenesis 15: 2859-2866

Ueng, Y., Shimada T., Yamazaki, H., and Guengerich F.P. (1995); Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. Chem Res. Toxicol. 8: 218-225

Ueng Y.F.; Kuwabara T.; Chun Y.J.; Guengerich F.P. (1997); Cooperativity in Oxidations Catalyzed by Cytochrome P450 3A4; Biochemistry; 36: 370-381

Van Duuren, B.L. und Goldschmidt, B.M. (1976); Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco-carcinogenesis; J. natl Cancer Inst.; 56: 1237-1242

VanRooij J.G.M.; De Roos J. H.C.; Bodelier-Bade M.M.; Jongeneelen F. J. (1993); Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Through Human Skin; Journal of Tox. Env. Health 38: 355-368

Wallenhorst T.; Schwenk M. (1998); Die aktuelle Sroffgruppe: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK); Umed Info (1998) 47-48

Waller D.G., Renwick A.G.; Gruchy B.S., George C.F. (1984); The first pass metabolism of nifedipine in man; Br. J. clin. Pharmac.; 18: 951-954

Wang J-S., Busby W.F., Wogan G.M.; Tissue (1995) a) Distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene; Cancer Letters; 92: 9-19

Wang, J-S; Busby W.F.Jr., Wogan G.M. (1995) b); Formation and persistance of DNA adducts in organs of CD-1 mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene; Carcinogenesis 16: 2609-2616

Waterman, M.R., Johnson, E.F. (1991); Methods in Enzymology, Volume 206, Cytochrome P450. Academic Press, San Diego

Wheeler, C.W., and Guenthner T.M. (1991) Cytochrome P450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung; J. Biochem. Toxicol; 6: 163-169,

Wickström K., Pysalo H., Plaami Heikkilä S., Tuominen J. (1986); Polycyclic aromatic compounds (PAC) in leaf lettuce; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 183: 182-185

Wood A.W., Chang, R.L., Levin W., Ryan D.E., Thomas P.E., Croisy-Delcey M., Ittah, Y., Yagi H., Jerina, D., Conney, A.,(1980) Mutagenicity of the Dihydrodiols and Bay-region Diol-Epoxides of Benzo(c)phenanthrene in bacterial and mammalian cells; Cancer Research, 40: 2876-2883

Wood, A.W., Richard L.C., Levin W., Thakker D.R., Yagi H., Sayer J.M., Jerina, D.,Conney A.H. (1984); Mutagenicity of the enantiomers of the Diastereomeric Bay-Region benzo(c)phenanthrene 3,4-Diol-1,2-epoxides in bacterial and mammalian cells; Cancer Res. 44: 2320-2324;

Wynder, E.L. und Hoffmann, D. (1959); A study of tobacco carcinogenesis VII. The role of higher polycyclic hydrocarbons; Cancer 12: 1079-1086

Yamazaki, H., Degawa M., Funae, J., Imaoka S., Inui, Y., Guengerich F.P., Shimada T. (1991) Roles of different cytochrome P450 enzymes in bioactivation of the potent hepatocarcinogen 3-methoxy-4-aminoazobenzene by rat and human liver microsomes, Carcinogenesis, 12: 133-139,

Yamazaki H., Oda y., Shimada T.(1992) 1); Use of the newly developed tester strain Salmonella typhimurium NM 2009 for the study of metabolic activation to carcinogenic aromatic amines by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes Mutat Res., 272: 183-192

Yamazaki, H., Inui, Y., Yon C.-H.; Guengerich F.P., und Shimada, T. (1992) 2); Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes; Carcinogenesis; 13: 1789-1794

Yamazaki H., Mimura M., Oda Y., Gonzalez F.J., El-Bayoumy K., Chae Y.-H. Guengerich F.P., Shimada T.(1994); Activation of trans-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-aminochrysene to genotoxic metabolites by rat and human cytochromes P450; Carcinogenesis; 15: 465-470

Yamazaki H., Inoue K., Turvy C.G., Guengerich F.P. und Tsutomu Shimada (1996); Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes; Drud Metab. Dispos.; 25: 168-174

Yang C.S., Brady J.F., Hong J.-Y. (1992); Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism , and toxicity, FASEB J., 6: 737-744

Young, R.J.; Mc Kay, W.J.; und Evans, J.M. (1978); Coal gasification and occupational health; Am. ind. Hyg. Assoc. J.; 39: 985-997

Yun, C-H., Shimada T., and Guengerich F.P.,(1992) Roles of human liver cytochrome P4502C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. Cancer Res., 52: 1868-1874

Zander M. Poycyclische Aromaten; Teubner; Stuttgart (1995)

Poster und Publikationen

M. Baum, W. Köhl, G. Eisenbrand, S. Amin; Metabolismus des polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Benzo(c)phenanthren nach Aktivierung durch menschliche Cyt P450-Enzyme
GDCH Lebensmittelchemische Gesellschaft: Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin 1997
Extended Abstract: Lebensmittelchemie 52: 33-56 (1998)

M. Baum, W. Köhl, S.S. Hecht, S.Amin, F.P. Guengerich, G. Eisenbrand; Metabolism of benzo[c]phenanthrene and genotoxicity of the corresponding dihydrodiols after activation by human microsomes in comparison to dibenzo[a,l]pyrene-11,12-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol
10th AEK-Symposium 24-26. März 1999
Abstract: Journal of Cancer Res. and Clinical Oncology, Suppl. to 125:(1999)

Vorträge

M. Baum, S. Böhm, W. Köhl, S. Amin, G. Eisenbrand; Aktivierung von Dihydrodiol-Metaboliten polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe durch menschliche Cytochrom P450-Enzyme
55.Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwestdeutschland der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in der GDCH 1997 in Trier
Abstract: Lebensmittelchemie 51:53-61 (1997)

M. Baum, D. Kasper, W. Köhl, G. Eisenbrand; Speziesunterschiede bei der *in vitro*-Aktivierung von Benzo(c)phenanthren
56. Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwestdeutschland der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in der GDCH 1998 in Gießen
Abstract: Lebensmittelchemie 52: 63-78 (1998)

Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei meinen Labornachbarn Ralf Hössel, Rüdiger Schneider, Monika Hofer, Bernd Mußler, Wolfgang Petry, Claudia Kunz, Volker Glaab und Barbara Wagner für das stets gute Miteinander bedanken.

Eric Fabian danke ich für alle Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Obidoa danke ich für das freundschaftliche Verhältnis im Labor sowie das kurzzeitig eingekehrte „afrikanische Flair".

Monika Hofer, Werner Köhl und Frau Dr. Janzowski möchte ich für ihre kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Werner Köhl danke ich für seine wertvollen Anregungen.

Volker Glaab danke ich für die ausführliche Anleitung zum HPRT-Test.

Herrn Prof. F. Guengerich danke ich für die freundliche Bereitstellung der humanen Organproben, der *S. typhimurium*-Stämme und rekombinanten CYP 450.
Herrn S. Amin danke ich für die Bereitstellung der PAK-Testsubstanzen.

Den Forschungspraktikanten und Praktikantinnen Delphine Letellier, Sonja Böhm, Achim Neu, Uta Szymanek und Diana Kasper danke ich für ihre geleistete Arbeit.

Meiner Frau Ute und meinen Kindern Johanna, Karolina und Franziska danke ich für ihre stete Unterstützung und Geduld.

Meinen Eltern danke ich für Alles.