



# UFZ-Bericht

UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH  
Zentralbibliothek  
Permoserstraße 15  
04318 Leipzig

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

rschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 13/1996

Dissertation

---

**Induktion von CYP1A1  
durch Xenobiotica in  
Leberzellkulturen von  
Regenbogenforellen**

---

Stefan Scholz

Sektion Chemische Ökotoxikologie  
UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH

ISSN 0948-9452

**Stefan Scholz**

# **Induktion von CYP1A1 durch Xenobiotica in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen**

**Doktorarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-  
Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Fachbereich  
Biochemie/Biotechnologie  
Vorgelegt im Dezember 1995**

**Durchgeführt vom 1.12.1992 - 31.3.1995, extern am Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH, Sektion Chemische Ökotoxikologie, AG Zelltoxikologie**

Die Betreuung erfolgte durch **Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß**, Martin-Luther-Universität  
Halle Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Abt. Allgemeine und  
Pflanzenbiochemie

## Danksagung

Folgenden Personen, die alle nicht unerheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit herzlich danken:

- Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß (Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Abt. Allgemeine und Pflanzenbiochemie) für die Übernahme der Betreuung.
- Herrn Prof. Dr. G. Schüürmann (Sektionsleiter Chemische Ökotoxikologie, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH) für die Ermöglichung der Durchführung der Doktorarbeit.
- Herrn PD Dr. Helmut Segner (Laborleiter AG Zelltoxikologie, Sektion Chemische Ökotoxikologie, UFZ) für die Betreuung *vor Ort*, für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, für die Unterstützung jeglicher Art und für die Gewährung der nötigen Freiräume.
- Herrn Prof. Dr. H.O. Gutzeit (TU Dresden, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Institut für Zoologie, Lehrstuhl für allgemeine Zoologie), für seine Unterstützung bei meinem Wechsel an die TU Dresden.
- Herrn PD Dr. Th. Braunbeck (Institut für Zoologie 1, Karl-Rupprechts-Universität Heidelberg) für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Zoologie und für die Unterstützung bei der Mikrosomenpräparation.
- Christof Hauck für die Einführung in die Zellkulturtechniken, für die Mithilfe bei der Mikrosomenpräparation und für alle gemeinsamen „Forschungsabenteuer“.
- Herrn Dr. H. Honeck (Max-Dellbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Enzymologie, Berlin) für die Reinigung von CYP1A1.
- Frau Dr. I. Behn (Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Institut für Zoologie Immunbiologie) für die Präparation des monoklonalen Antikörpers.
- Frau I. Christmann und I. Ränker für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfe im Labor.
- Christiane Grasse, Kerstin Klöttermann und Jaqueline Nowak für ihre Mithilfe bei den Enzymkinetiken
- Dr. Ivo Feusner (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) für die Einführung in die Western Blot-Technik

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Tierhaltung</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Mikrosomenpräparation</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Präparation von Mikrosomen aus Primärzellkulturen</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Reinigung von CYP1A1</b>	<b>5</b>
<b>2.5 Nachweis des CYP1A1 Isoenzym</b>	<b>6</b>
<b>2.6 Spektrophotometrische Nachweismethoden</b>	<b>6</b>
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	6
2.6.2 Gesamt Cytochrom P450-Gehalt	6
2.6.3 Glutathion-S-transferase GST	7
2.6.4 Glutamat-Pyruvat-Transaminase GPT	7
2.6.5 Lactatdehydrogenase LDH	8
2.6.6 NADPH Cytochrom c (P450)-Reductase NCR	8
2.6.7 Phosphoenolpyruvatcarboxykinase PEPCK	8
2.6.8 UDP-Glucuronyltransferase UGT	9
<b>2.7 Fluorimetrische Nachweismethoden</b>	<b>9</b>
2.7.1 Bestimmung der DNA-Konzentration	9
2.7.2 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase EROD	10
2.7.3 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase ECOD	10
<b>2.8 Bestimmung von pH- und Temperaturoptima, <math>V_{max}</math>- und <math>k_m</math>-Wert</b>	<b>11</b>
<b>2.9 Präparation monoklonaler Antikörper</b>	<b>11</b>
<b>2.10 Kultur von Zelllinien</b>	<b>12</b>
<b>2.11 Isolierung und Kultur von Leberzellen</b>	<b>12</b>
2.11.1 Primärkultur von Hepatozyten der Regenbogenforellen	12
2.11.2 Primärkultur von Hepatozyten des Speisekarpfens ( <i>Cyprinus carpio</i> )	13
<b>2.12 Modifizierung der Kulturbedingungen von isolierten Forellenhepatocyten</b>	<b>13</b>
2.12.1 Beschichtung der Kulturschalen mit Collagen Typ I	13
2.12.2 Zusatz von Hormonen und Kofaktoren zum Medium	13
2.12.3 Kokultur von Hepatocyten mit verschiedenen Fischzelllinien	14
<b>2.13 Präparation der Zellkulturhomogenate</b>	<b>14</b>
<b>2.14 Induktion von CYP1A1 in Leberzellkulturen</b>	<b>14</b>
<b>2.15 Berechnung von <math>EC_{50}</math> und maximaler induzierter Aktivität (bzw. CYP1A1-Konzentration)</b>	<b>14</b>
<b>2.16 Messung der Induktionskapazität für CYP1A1 von Umweltproben</b>	<b>15</b>
<b>2.17 Western Blotting und Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	<b>15</b>

<b>2.18 ELISA</b>	<b>16</b>
2.18.1 Direkter ELISA	16
2.18.2 Kompetitiver ELISA	17
<b>2.19 Statistik</b>	<b>17</b>
<b>3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1 und zur Durchführung von Induktionsstudien in Primärzellkulturen von Hepatocyten der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Zusammenfassung</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Einleitung</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.3.1 Präparation der Mikrosomenfraktion	21
3.3.2 Reinigung von CYP1A1	21
3.3.3 Präparation des monoklonalen Antikörpers	23
3.3.4 Entwicklung eines ELISAs	28
<b>3.4 Diskussion</b>	<b>31</b>
3.4.1 In vivo Beobachtungen über Biotransformationsenzyme der Forellenleber	31
3.4.2 Charakterisierung des Antikörpers und seine Verwendung in Primärzellkulturen	32
<b>4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Hepatozyten der Regenbogenforelle in Primärkultur: Einfluß der Kulturbedingungen</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Zusammenfassung</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Einleitung</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.3.1 Einfluß der Zellaggregation auf die Ausbildung spezifischer Funktionen der Leberzellen	37
4.3.2 Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen	37
4.3.3 Supplementierung des Kulturmediums	39
4.3.4 Kokulturen mit verschiedenen Zelllinien	41
<b>4.4 Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>5. Induktion von CYP1A1 in Leberzellkulturen der Regenbogenforelle:</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Einleitung</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Ergebnisse</b>	<b>55</b>
5.3.1 Konzentrations-Wirkungskurven zur CYP1A1-Induktion,	55
5.3.2 Berechnung und Auswertung von maximal induzierbarer CYP1A1-Menge und EC <sub>50</sub> -Werten	59
5.3.3 Einfluß auf die Zytotoxizität und die GST-Aktivität	65
<b>5.4 Diskussion</b>	<b>65</b>
5.4.1 Charakterisierung polyaromatischer Hydrokarbone durch CYP1A1-Induktion	65
5.4.2 Induktion von CYP1A1 durch Deponieeluate	71

<b>6. Charakterisierung und Vergleich von Biotransformations- und charakteristischen Leberenzymen bei Karpfen und Regenbogenforelle</b>	<b>74</b>
<b>6.1 Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>6.2 Einleitung</b>	<b>74</b>
<b>6.3 Ergebnisse</b>	<b>75</b>
6.3.1 pH-Optima	75
6.3.2 In vitro-Temperaturoptima	75
6.3.3 Abhängigkeit der NCR von der KCN-Konzentration	76
6.3.4 Abhängigkeit von der Substratkonzentration	77
6.3.5 Vergleich von Leberzellkulturen aus Karpfen und Forelle	82
<b>6.4 Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>7. Biotransformationsenzyme in Zelllinien aus Regenbogenforelle und Karpfen</b>	<b>89</b>
<b>7.1 Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>7.2 Einleitung</b>	<b>89</b>
<b>7.3 Ergebnisse</b>	<b>90</b>
7.3.1 Aktivitäten verschiedener Biotransformationsenzyme in Zelllinien	91
7.3.2 Einfluß von CYP1A1-Induktoren auf die Aktivität von Biotransformationsenzymen in RTG- und RTH-Zellen	91
<b>7.4 Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>8. Abschlußbemerkungen</b>	<b>96</b>
<b>9. Literatur</b>	<b>99</b>
<b>Anhang</b>	<b>A1-A2</b>

## 1. Einleitung

### Die Bedeutung Fremdstoff-induzierbarer Proteine

Organismen können auf zellulärem und subzellulärem Niveau in verschiedenster Weise auf die Exposition mit Umweltchemikalien reagieren. Da Tiere und Pflanzen nicht erst seit der Industrialisierung durch den Menschen Schadstoffen ausgesetzt sind, mußten sich frühzeitig Systeme zum Schutz gegen „natürliche“ Toxine entwickeln, um das Überleben der Arten zu gewährleisten. Darauf deutet die universelle Verbreitung der verschiedenen Schutzsysteme auf allen Organisationsstufen hin.

Viele dieser Schutzsysteme sind induzierbar, d.h. sie basieren auf bestimmten Proteinen, die normalerweise nicht oder konstitutiv nur in geringen Mengen gebildet und bei Exposition mit einem Schadstoff verstärkt synthetisiert werden. Sie helfen der Zelle, die effektive Schadstoffkonzentration zu verringern, fördern die Metabolisierung und nachfolgende Exkretion oder sind in der Reparatur und Stabilisierung geschädigter Zellbestandteile involviert (siehe Abb. 1.1). Ihre Induktionseigenschaft kann dazu benutzt werden, um eine Belastung mit Schadstoffen nachzuweisen oder Xenobiotica anhand ihrer Induktionskapazität zu charakterisieren. Der Nachweis der Induktion basiert auf der Detektion der vermehrt gebildeten Proteine bzw. der für die Proteinsynthese verantwortlichen mRNA. Hierzu können sowohl molekularbiologische (Nachweis über die Hybridisierung der mRNA mit einer markierten cDNA), enzymatische (Messung der Zunahme der Enzymaktivität) als auch immunologische Methoden (Nachweis des Proteins mit spezifischen Antikörpern in ELISA oder Western Blot) eingesetzt werden (Stegeman et al., 1992).

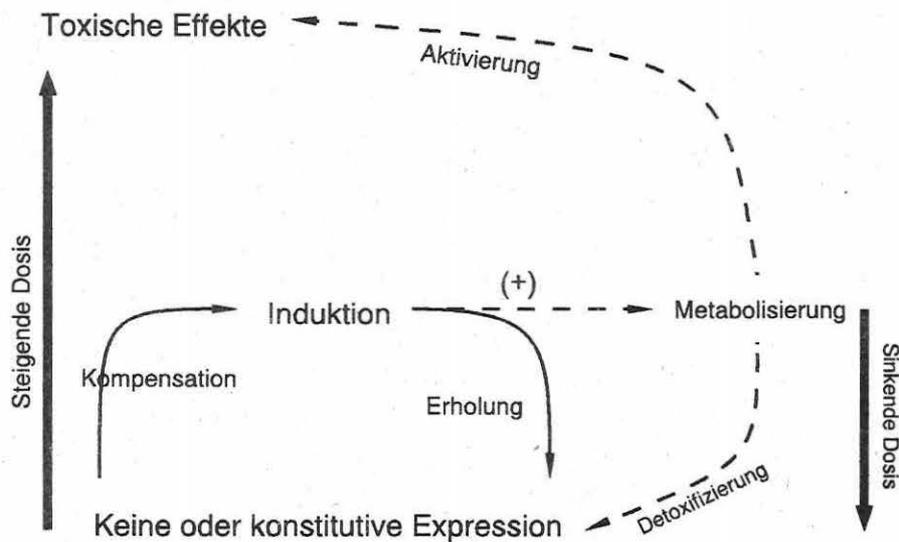


Abb. 1.1: Bedeutung der Induktion von Proteinen für die Kompensation von Schadstoffen und die Entstehung toxischer Effekte.

Der Nachweis Xenobiotica-induzierter Proteine bedeutet nicht zwingend, daß toxische bzw. irreversible Schädwirkungen für Zelle, Organismus, Population oder Ökosystem vorliegen müssen. In gewissem Maße kann durch die Induktion bestimmter Proteine eine Schädwir-

## 1. Einleitung: Bedeutung Fremdstoff-induzierbarer Proteine

kung bis zur völligen Erholung kompensiert werden. Ob bei entsprechender Induktion toxische Effekte vorliegen, kann nur durch begleitende Toxizitätsuntersuchungen verifiziert werden. Dafür kann der Nachweis Schadstoff-induzierter Proteine als Frühwarnsignal betrachtet werden, das auf potentiell mögliche toxische Folgen auf den verschiedenen Ebenen biologischer Organisationsstufen hindeutet (Depledge & Fossi, 1994; Ernst & Peterson, 1994; Peakall, 1994; Peakall & Walker, 1994).

Als bedeutende Beispiele für zelluläre Schutzproteine, die durch die verschiedensten Xenobiotica induziert werden, können die folgenden vier Systeme genannt werden (Stegeman et al., 1992):

1. Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT), Peroxidase (POD), Glutathionreduktase (GR): Diese Enzyme sind in der Beseitigung der in der Atmungskette entstehenden, für die Zelle aufgrund der Oxidation von Proteinen und Lipiden gefährlichen Radikale involviert. Bestimmte Umweltschadstoffe, insbesondere Luftschadstoffe wie  $\text{SO}_2$ ,  $\text{O}_3$ , und  $\text{NO}_x$  führen zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und zu einer Induktion von SOD, CAT, POD und GR. Die Belastung von Pflanzen durch luftgetragene Schadstoffe konnte mit Hilfe dieser Enzyme nachgewiesen werden.

2. Metallothioneine können eine Vielzahl von Schwermetallen binden. Bei erhöhtem Schwermetalltiter wird ihre Bildung induziert und toxische Schwermetalle können gebunden werden.

3. Hitzeschockproteine: Sie werden insbesondere bei erhöhter Temperatur gebildet und sind im Abbau von hitzegeschädigten Proteinen und bei der Stabilisierung und Faltung neu synthetisierter Proteine (als Chaperonine) involviert. Sie sind aber nicht nur durch Hitze sondern auch durch die verschiedensten Schadstoffe induzierbar und können sowohl in Bakterien als auch in höheren Organismen und verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.

4. Cytochrom P450: Hierbei handelt es sich, um eine Familie einer großen Zahl von Isoenzymen, die sich durch ein charakteristisches Absorptionsmaximum im CO-Differenzspektrum bei 450 nm auszeichnen. Die P450-Cytochrome sind membranständige Enzyme und insbesondere im endoplasmatischen Retikulum der Eukaryonten zu finden. Ihre Verbreitung erstreckt sich über das gesamte Tier- und Pflanzenreich und die Bakterien. Sie sind bei den verschiedensten Metabolisierungsprozessen endogener und exogener Verbindungen beteiligt. Das wichtigste Isoenzym im Zusammenhang mit der Induktion durch Schadstoffe ist das sogenannte CYP1A1. Es ist durch polyaromatische (chlorierte) Kohlenwasserstoffe (PAHs), um ein Vielfaches seiner konstitutiven Konzentration induzierbar und katalysiert die Oxidierung von PAHs. Neben dem CYP1A1-Isoenzym ist auch für Enzyme wie die Glutathion-S-transferase (GST) und die UDP-Glucuronyltransferase (UGT) eine Induktion durch PAHs über den Ah-Rezeptor nachgewiesen. Beide Enzyme sind an der Konjugation von Xenobiotica an niedermolekulare Substanzen, die zu einer verstärkten Exkretion führt, beteiligt.

In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit soll die Induktion von CYP1A1 durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe beschrieben werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Induktion in den Zellen aquatischer Organismen. Die durch anthropogene Aktivitäten in die Umwelt gelangten polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAHs, z.B. aus Verbrennung fossiler Brennstoffe und Ölkontaminationen) und chlorierten Polyaromate wie Dioxine, PCB u.a. (Hausbrand und Hausmüllverbrennung, Isolationsmaterialien, Brandschutzmaterialien u.a.) können - entweder durch die Einleitung in Abwässern oder durch die Auswaschung von luftgetragenen und bodengebundenen Partikeln - in Oberflächen- und Grundwasser wiedergefunden werden. Sie zeichnen sich durch ihren hohen Lipophiliegrad,

eine hohe Persistenz und eine toxische Wirkung aus. Aquatische Organismen wie Fische sind aufgrund der Einleitung kontaminierter Abwässer in ihren Lebensraum in besonderem Maße durch (chlorierte) PAHs betroffen (Marquardt & Schäfer, 1994a; Neff, 1984; Safe, 1984).

Die Bedeutung der Metabolisierung, insbesondere die Oxidation dieser Schadstoffe durch CYP1A1 liegt - wie in den Kapiteln 3 und 5 ausführlich erläutert - in der Entstehung von Verbindungen mit einer gegenüber der Ausgangsverbindung erhöhten Polarität. Durch die nachfolgende Konjugation an verschiedene niedermolekulare Substanzen wird prinzipiell die Elimination bzw. Exkretion dieser Substanzen aus dem Organismus erleichtert und die Bioakkumulation verringert. Die Oxidation durch CYP1A1 führt aber nicht in jedem Fall zu einer Eliminierung von Schadstoffen, sondern kann diese u.U. aktivieren, so daß - wie im klassischen Beispiel des Benzo(a)pyrens - Metabolite entstehen, die von höherer Toxizität als die Ausgangsverbindungen sind und z.B. an verschiedene Zellbestandteile wie die DNA binden können. Eine Charakterisierung der CYP1A1-Induktion eines Schadstoffes kann daher wichtige Hinweise für seinen Verbleib in der Umwelt und für die Beurteilung seiner Schädwirkung liefern (Lech & Vodcnik, 1984; Spacie & Hamelink, 1984).

In der vorliegenden Untersuchung sollte die Induktion von CYP1A1 in einem *in vitro* System - der Primärkultur von Regenbogenforellen-Hepatozyten - charakterisiert werden. Neben der Vermeidung von Tierversuchen und der Reduzierung des Tierverbrauches bieten Zellkultursysteme den Vorteil einer besseren Kontrollierbarkeit der Ergebnisse. Der Versuchsaufwand ist im Vergleich zu einem Tierversuch drastisch reduziert, so daß die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener Chemikalien, die bei mehreren Konzentrationen gemessen werden müssen, erleichtert ist.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Primärkultursystems aus Hepatozyten der Regenbogenforelle zum Nachweis einer Fremdstoff-bedingten Induktion von CYP1A1. Der Ergebnisteil dieser Arbeit (Kapitel 3-7) gliedert sich daher in 5 Abschnitte, die verschiedene Aspekte und Probleme beim Einsatz von Primärkulturen und der Entwicklung von Methoden zum Nachweis der Induktion von CYP1A1 beleuchten sollen:

- Kapitel 3 behandelt die Entwicklung eines monoklonalen, für CYP1A1 der Forelle spezifischen Antikörpers, der neben der enzymatischen Detektion ein wichtiges Hilfsmittel für den Nachweis von CYP1A1 darstellt.

- In Kapitel 4 wird die Physiologie von kultivierten Forellenhepatozyten und die Expression von Biotransformationsenzymen untersucht, um optimale Kulturbedingungen für den Nachweis der CYP1A1-Induktion zu identifizieren.

- Kapitel 5 baut auf den in den vorausgegangenen Kapiteln erarbeiteten Methoden auf und setzt diese exemplarisch für die Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven von vier polyaromatischen Hydrokarbonen mit Hilfe enzymatischer und immunologischer Meßmethoden ein. Die Ergebnisse werden mit publizierten Daten zur Rezeptoraffinität verglichen.

- In Kapitel 6 werden Temperatur- und pH-Optimum der verschiedener (Biotransformations-) Enzyme sowie ihre  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte untersucht. Die Charakterisierung durch diese Parameter wird zum Vergleich zweier verschiedener Spezies - der Forelle (*Oncorhynchus mykiss*) und des Karpfens (*Cyprinus carpio*) - bezüglich ihrer Enzymaktivitäten in der Leber und deren zeitlicher Verlauf in der Primärkultur herangezogen. Die Probleme, die sich hieraus für die Extrapolation von Meßergebnissen auf andere Spezies ergeben, sollen erläutert werden.

- Im Kapitel 7 wird untersucht, ob Zelllinien für die in den vorangegangenen Kapitel durchgeführten Untersuchungen eingesetzt werden können, und ob ggf. auf die Isolierung von Hepatozyten verzichtet werden kann.

## 2. Material und Methoden

Zusammensetzung nicht aufgeführter Puffer und Lösungen siehe Anhang.

### 2.1. Tierhaltung

Für die Präparation der monoklonalen Antikörper wurden BALB/c (Charles River) Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in der Fakultät für Biowissenschaften, Institut für Zoologie/Immunbiologie (Frau Dr. I. Behn) der Universität Leipzig gehalten und betreut. Futter stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

Die Haltung 200-300 g schwerer Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) erfolgte sowohl in Heidelberg (Ruprecht-Karls-Universität, Institut für Zoologie, AG Dr. Thomas Braunbeck) als auch im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Chemische Ökotoxikologie). Die Tiere stammten jeweils von Fischzüchtern aus der Umgebung (Juraquell, Wellheim bzw. Sachsenstör, Rötha) und wurden mit kommerziell erhältlichem Forellenfutter (Raiffaisen AG) oder Schwimmfutter der Firma Parthenwerk (Taucha) täglich einmal gefüttert, so daß das Futter innerhalb weniger Minuten aufgefressen wurde. Die Halterung erfolgte entweder im Brunnenwasser oder im gefiltertem, entchlortem Brauchwasser unter ständiger Begasung mit Druckluft im Durchflußsystem bei einer Flußrate von 3-5 l/min. Pro 1000 l Becken wurden maximal 50 Forellen gehalten. Die Wassertemperatur betrug zwischen 12°C (Winter) und 15°C (Sommer).

### 2.2. Mikrosomenpräparation

Die Präparation wurde nach einer von Dr. H. Honeck (Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Enzymologie, Berlin) entwickelten Vorschrift durchgeführt:

200-300 g schwere Regenbogenforellen wurden intraperitoneal mit einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht BNF (7,5 mg/ml Dorschleberöl) injiziert. 5 Tage später wurden die Tiere mit einer Überdosis des Betäubungsmittels Benzocain (4 g/l) getötet. Die Bauchdecke wurde mit einer Präparierschere so geöffnet, daß das Pericard und die Leber leicht zugänglich waren. Eine Kanüle wurde in das Herz des Fisches eingeführt und mit NaCl Lösung solange gespült bis die Leber vollständig vom Blut entfärbt war. Danach wurde die Leber präpariert, gewogen, mit eiskalter NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Alle folgenden Schritte fanden unter Eiskühlung statt.

Die Leberstückchen wurden mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator bei 300 rpm homogenisiert. Hierzu wurden 4 ml Homogenisationspuffer pro g Lebergewicht verwendet.

Für die Präparation der Mikrosomen wurde das Homogenat zuerst bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und bei 20 000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde in einer Ultrazentrifuge für 90 min bei 100 000 g zentrifugiert. Das Pellet stellte die Mikrosomenfraktion dar und wurde in Mikrosomenpuffer resuspendiert (0,5 ml Puffer/g eingesetzte Leber). Die Mikrosomen wurden portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Reinigung des CYP1A1 (Cytochrom P450 1A1) bei -80°C gelagert.

Auf diese Art und Weise wurden die Mikrosomen der Lebern von 58 Regenbogenforellen in 10 Aufarbeitungsansätzen präpariert. Bei jeder Aufarbeitung wurden Aliquots des Homogenats (10 000 g Überstand) und der Mikrosomen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C für Referenzzytmessungen gelagert.

### 2.3. Präparation von Mikrosomen aus Primärzellkulturen

Ca.  $1 \times 10^6$  Leberzellen wurden für die Präparation der Mikrosomen verwendet. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Kulturgefäßen abgelöst, in 100 µl PBS resuspendiert und für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde im Homogenisationspuffer aufgenommen und durch Ultraschall (2 mal 10 sec) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 10 000 g für 10 min wurde der Überstand für 90 min bei 100 000 g zentrifugiert. Das Mikrosomenpellet wurde in Beschichtungspuffer (50 mM Na-hydrogencarbonat, pH 9,5) aufgenommen und auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt.

### 2.4. Reinigung von CYP1A1

Die Reinigung wurde von Herrn Dr. H. Honeck am MDC (Max-Dellbrück-Centrum für molekulare Medizin, Enzymologie, Berlin) durchgeführt.

Folgende Teilschritte wurden durchgeführt, um ein gereinigtes CYP1A1 zu erhalten:

1. Solubilisierung in 0,8 % Cholat
2. Hydrophobe Chromatographie an  $\omega$ -Aminooctyl-Sepharose 4B (hergestellt am MDC)
3. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Toyopearl 650 M, Gradientenelution
4. Chromatographie an Hydroxylapatit (Schritt 3. und 4. wurden an einer FPLC-Apparatur der Firma Pharmacia durchgeführt)
5. Detergensentfernung

Mikrosomen von BNF-induzierten Regenbogenforellen wurden in Cholat-haltigem Puffer (0,8 % Cholat, 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE und 0,25 mM PMSF) auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml Protein eingestellt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurde diese Lösung für 60 min in einer Ultrazentrifuge bei 100 000 g zentrifugiert.

Der Überstand enthielt das gelöste Cytochrom P450 und wurde weiter mit einer  $\omega$ -Aminooctyl-Sepharose 4B Säule gereinigt. Die Säule wurde mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 20 % Glycerin, 0,25 % KCl, 1 mM EDTA 0,1 mM DTE und 0,4 % Cholat eluiert. Die P450-Lösung wurde auf die Konzentrationen des Equilibrierungspuffers eingestellt und die Säule mit 2-3 nmol P450/ml  $\omega$ -Aminooctyl-Sepharose 4B-Gel beladen. Nach einem Waschschritt mit Equilibrierungspuffer wurde das P450 mit 0,3% Emulgen 911 (Kao Corporation, Tokyo) in Equilibrierungspuffer eluiert. Die P450 enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und durch Zentrifugation über eine PM 30 Membran konzentriert.

Mit einer NAP-Säule (Pharmacia) wurde das P450 auf 10 mM Tris/Essigsäure pH 7,5, 20 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE und 0,4 % Emulgen 911 umgepuffert. Die weitere Reinigung wurde mit einer DEAE-Toyopearl 550 Säule auf einer FPLC Apparatur durchgeführt. Die Säule (1 cm x 10 cm, 7 ml Gel) wurde mit 170 ml des Tris/Essigsäure Puffers equilibriert und mit 60 nmol P450 beladen. Eluiert wurde mit einem Stufengradienten bei einer Endkonzentration von 0,8 M Essigsäure. Die verschiedenen Stufen waren 4, 10, 40 und 100 % 0,8 M Essigsäure. Die Fraktionen, die das CYP1A1 enthielten wurden gesammelt und durch PM 30-Zentrifugation konzentriert. Im nächsten Reinigungsschritt wurde eine hydrophobe Hydroxylapatit Säule benutzt. Säule und CYP1A1-Lösung wurden auf einen Puffer folgender Konzentration eingestellt: 10 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 20 % Glycerin, 0,3 % Emulgen 911, 0,1 % Cholat, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM DTE. Nachdem die Säule mit 40 nmol P450 beladen worden war, wurde sie mit einem linearen Gradienten (Gesamtvolumen 100 ml, Endkonzentration 0,1 M Kaliumphosphat) eluiert. CYP1A1 enthaltende Fraktionen wurden identifiziert und gesammelt.

In einem letzten Reinigungsschritt wurden die Detergentien entfernt, die für die Herauslösung des P450 aus den mikrosomalen Membranen notwendig waren. Hierzu wurde die CYP1A1-Lösung aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt konzentriert und dann 10fach in Hydroxylapatit-Säulenpuffer verdünnt. Eine Hydroxylapatit-Säule wurde mit CYP1A1 beladen und dann mit 100-200 ml Emulgen- und Cholat-freiem Puffer gewaschen, während das Eluat auf 280 nm Absorption untersucht wurde. CYP1A1 wurde mit einem 0,4 molaren Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 (20 % Glycerin, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM DTE eluiert.

### 2.5 Nachweis des CYP1A1 Isoenzym

Die Fraktionen, die das CYP1A1 Isoenzyme enthielten wurden durch Kreuzreaktion mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ratten CYP1A1 (durchgeführt von Dr. H. Honeck, MDC Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin) und durch N-terminale Proteinsequenzierung (durchgeführt von Dr. Otto, ebenfalls MDC, Berlin) nachgewiesen.

### 2.6 Spektrophotometrische Nachweismethoden

Alle Enzymmessungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die kinetischen Messungen sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten und mit einem SLT Spectra Plattenphotometer. Wenn nicht anders angegeben wurden 3fach Bestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung von optimalen Reaktionsbedingungen wurden die eingesetzten Mengen der Substrate und anderen Bestandteile teilweise variiert.

*Die dargestellten Reaktionsschemata erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit bezüglich der an der Reaktion beteiligten Substrate und Coenzyme und dienen nur der Illustration der Meßvorschriften.*

#### 2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Homogenat (10 000 g Überstand) und Mikrosomen wurden 10-100fach mit Aqua dest. verdünnt. Je 10 µl der verdünnten Proben wurden mit 250 µl Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml Ethanol, 100 ml 85 % Phosphorsäure, ad 1 l Aqua dest.) versetzt und nach 15 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Konzentrationen wurden über eine Eichkurve mit BSA ermittelt.

#### 2.6.2 Gesamt-Cytochrom P450-Gehalt (Omura & Sato, 1964)

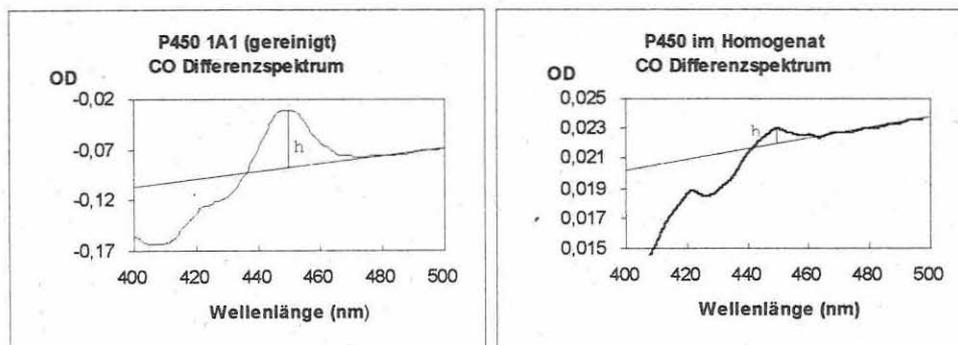
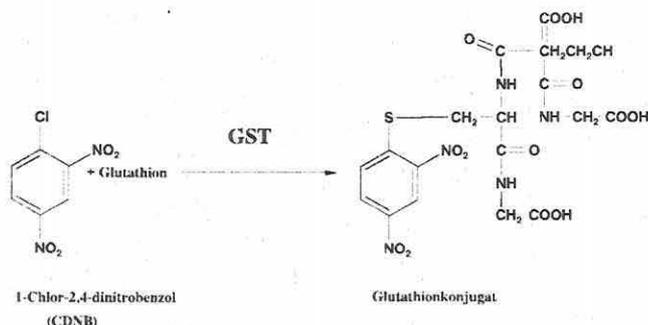


Abb. 2.1: Cytochrom P450-Differenzspektren nach CO-Begasung. Die beiden Graphiken sollen die Berechnungsmethode für die Peakhöhe (=h) bei 450 nm illustrieren (rechts: Homogenat aus 2 Tage alten Zellkulturen).

75 µl Homogenat (10 000 g Überstand) von Primärzellkulturen und Lebergewebe oder 1:10 verdünnte Mikrosomenproben wurden mit der gleichen Menge von P450-Puffer (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5) vermischt und mit einer Spatelspitze von Na-dithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ ) versetzt. Die Probe wurde dann auf zwei 50 µl Küvetten aufgeteilt. Eine der Küvetten wurde für 20 sec mit Kohlenmonoxid begast, die andere diente als Referenzkuvette für das Differenzspektrum. Das Differenzspektrum wurde mit einem Zweistrahlphotometer (Lambda 2S, Perkin Elmer) aufgezeichnet. Die Konzentration ermittelte sich aus der Peak-Höhe bei 450 nm zur Basislinie bei 490 nm (siehe Abb. 2.1) und wurde mit dem molaren Extinktionsfaktor  $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  von Omura & Sato bestimmt.

### 2.6.3 Glutathion-S-transferase GST (Habig et al., 1974)



GST ist ein Enzym der Phase 2 der Biotransformation. Es katalysiert die Kopplung eines aromatischen Moleküls an Glutathion. Hierdurch wird eine Exkretion des konjugierten Stoffes erleichtert. Nach Abspaltung von Glutamat und Glycin können die Konjugate als Mercaptursäuren im Harn ausgeschieden werden.

Der Reaktionsansatz für GST enthält:

Phosphat Puffer pH 6,5	100 mM
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (Serva)	0,9 mM
Glutathion, reduziert (Serva)	1 mM
Probe	10-100 µg Protein/ml

Die Reaktion wurde mit Glutathion gestartet und die Absorptionsänderung bei 340 nm aufgezeichnet.

### 2.6.4 Glutamat-Pyruvat-Transaminase GPT (Mommssen et al., 1980)



Die GPT wurde als für den Leberstoffwechsel bedeutendes Enzym gemessen. Sie ist am Aminosäurestoffwechsel beteiligt, wo sie die Übertragung einer Aminogruppe einer Reihe von Aminosäuren auf  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysiert. Das entstandene Glutamat kann daraufhin oxidativ unter Entstehung von  $\text{NH}_4^+$  abgebaut werden. Hier wurde es mit Hilfe der Kopplung an die Lactatdehydrogenase (LDH) nachgewiesen.

Zusammensetzung des Reaktionspuffers:

Tris/HCl pH 7,5	50 mM
L-Alanin (Sigma)	200 mM
Pyridoxalphosphat (Sigma)	0,4 mM
$\alpha$ -Ketoglutarat (Sigma)	20 mM
LDH (Boehringer)	1 U/ml
NADH (Boehringer)	0,14 mM

## 2. Material und Methoden

Probe 10-100 µg Protein/ml  
Die Reaktion wurde mit  $\alpha$ -Ketoglutarat gestartet und die Absorptionsänderung von NADH bei 340 nm verfolgt.

### 2.6.5 Lactatdehydrogenase LDH (Weißhaar et al., 1975)



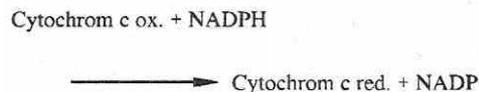
Die LDH-Freisetzung wurde routinemäßig als Zellvitalitätsparameter eingesetzt. Geschädigte Zellen geben in erhöhtem Maße LDH in das umgebende Medium ab. Die Aktivität der LDH kann im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

Tris/HCl pH 7	60 mM
Pyruvat (Serva)	1,1 mM
NADH	0,14 mM
Zellkulturmedium	50 µl

Die LDH-Aktivität konnte durch Messung der NADH-Absorption bei 340 nm nachgewiesen werden.

### 2.6.6 NADPH Cytochrom c (P450)-Reductase NCR (Kennedy, C.J., 1994)

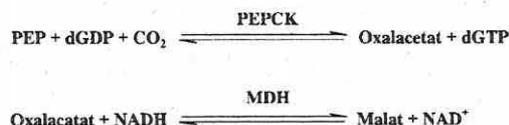


NCR überträgt Elektronen von NADPH auf Cytochrom P450. Die hier beschriebene Methode benutzt Cytochrom c als Elektronenakzeptor. Mit NADH als Donor ist NCR teil der Atmungskette. KCN im Reaktionsansatz soll nicht mikrosomale Aktivitäten unterdrücken.

Phosphat Puffer, pH 7,5	40 mM
EDTA	4,6 mM
KCN	0,5 mM
Cytochrom c, oxidiert (Sigma)	100 µM
NADPH (Serva)	40 µM
Probe	0,1-1 mg/ml

Die Reaktion wurde durch NADPH gestartet und die Absorptionsänderung des reduzierten Cytochrom c bei 550 nm aufgezeichnet.

### 2.6.7 Phosphoenolpyruvatcarboxykinase PEPCK (Petrescu et al., 1979)



Die PEPCK wurde wie die Glutamat-Pyruvat-Transaminase als spezifisches Leberenzym (Gluconeogenese) zur Überprüfung der Funktionalität von Leberzellen in der Primäkkultur untersucht. Der Nachweis gelingt mit Malatdehydrogenase (MDH) als Hilfsenzym über die Umsetzung des entstehenden Oxalacetats.

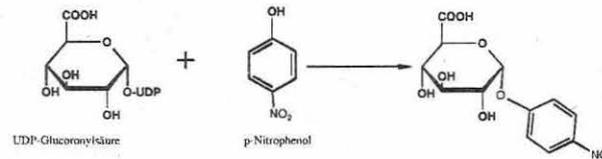
Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

Tris/HCl pH 7,5	50 mM
MnCl <sub>2</sub>	1 mM
Phosphoenolpyruvat (Serva)	1,5 mM
NADH	0,12 mM

NaHCO <sub>3</sub>	1,5 mM
MDH (Boehringer)	2 U/ml
Desoxyguanosin-5'-diphosphat (Sigma)	15 mM
Probe	0,1-1 mg/ml Protein

Die Reaktion wurde mit Desoxyguanosin-5'-diphosphat gestartet und die Absorptionsänderung bei 340 nm verfolgt.

### 2.6.8 UDP-Glucuronyltransferase UGT (Castren & Oikari, 1983)



Die UGT ist ein weiteres Phase 2 Enzym und überträgt einen aktivierten Glucuronylsäurerest auf das Substrat. Wie GST und die Sulfotransferasen erhöht es dadurch die Polarität aromatischer Moleküle und erleichtert damit deren Exkretion.

Inkubationsmedium:

Kaliumphosphat pH 7,5	0,5 M
p-Nitrophenol (Sigma)	0,34 mM
EDTA-Na <sub>2</sub>	10 mM
UDP-Glucuronylsäure (Sigma)	6,8 mM

10 µl einer Homogenat- oder Mikrosomenprobe wurden unverdünnt mit 50 µl Saccharose (0,25 M) und 25 µl Inkubationsmedium versetzt, bei 25°C für 30 min inkubiert und dann durch Zugabe von 125 µl eiskalter 3 %iger TCA gestoppt. Leerwerte wurden direkt auf Eis pipettiert und sofort mit TCA abgestoppt. Alle Ansätze wurden für 5 min bei 3000 g zentrifugiert. 180 µl des Überstandes wurden mit 50 µl 5 N NaOH versetzt und die Absorptionsänderung des p-Nitrophenols bei 415 nm gemessen.

## 2.7 Fluorimetrische Nachweismethoden

Alle fluorimetrischen Nachweismethoden wurden entweder in 2 ml Ansätzen mit einem Fluoreszenzphotometer (LS50 B, Perkin Elmer) oder in speziellen Mikrotiterplatten (SLT) mit einem Fluoreszenzplattenphotometer (SLT-Fluostar) durchgeführt. Die kinetischen Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung von optimalen Reaktionsbedingungen wurden die eingesetzten Mengen der Substrate und anderen Bestandteile teilweise variiert.

*Die dargestellten Reaktionsschemata erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit bezüglich der an der Reaktion beteiligten Substrate und dienen nur der Illustration der Meßvorschriften.*

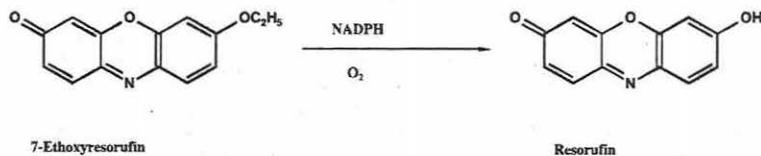
### 2.7.1 Bestimmung der DNA-Konzentration (Johnson-Wint & Hollis, 1982)

Die DNA Konzentration wurde mit Hilfe des an die DNA bindenden Farbstoff Hoechst 33253 (Sigma) bestimmt. Zellhomogenate (vor der 10 000 g Zentrifugation !!!) wurden mit SSC-Puffer (8,8 g/l NaCl, 4,4 g/l Citronensäure pH 7,0) 1:20 verdünnt. Jeweils 50 µl der Probe und 7 Standardlösungen (20, 10, 5 µg/ml usw. in SSC-Puffer) in Dreifach-Bestimmungen wurden in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert. 50 µl 0,02 % SDS in SSC-Puffer wurden dazugegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µl der Farb-

## 2. Material und Methoden

stofflösung (1,0 µg/ml Hoechst 33253) dazugegeben und die Intensität bei einer Excitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen.

### 2.7.2 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase EROD (Pluta, 1992a, b)



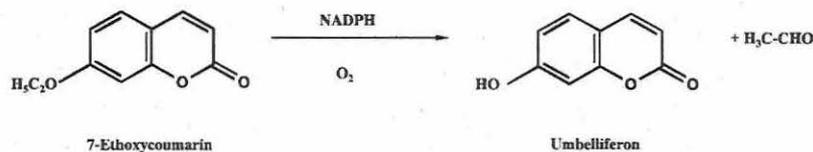
EROD wurde als die spezifische Enzymaktivität von CYP1A1 mit Hilfe der Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin gemessen.

Der Reaktionsansatz enthielt

Phosphat pH 7,8	0,1 M
KCl	0,15 M
7-Ethoxyresorufin (Sigma)	50 nM
NADPH	50 µM
Probe	0,01-1 mg/ml Protein (Homogenat oder Mikrosomen)

Die Reaktion wurde durch Mischung von Reaktionsansatz und Probe gestartet und die Intensität des Resorufins bei einer Excitationswellenlänge von 544 und einer Emission von 590 gemessen. Die Kalkulation der Enzymaktivitäten erfolgte mit Hilfe einer Resorufin-Eichkurve (Sigma).

### 2.7.3 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase ECOD (Pluta, 1992a)



ECOD kann ebenfalls zum Nachweis von CYP1A1 gemessen werden.

Der Reaktionsansatz enthielt

Tris/HCl pH 7,8	0,4 M
7-Ethoxycoumarin (Sigma)	0,04 nM
NADPH	1,7 mM
Probe	0,3-3 mg/ml Protein (Homogenat oder Mikrosomen)

Die Reaktion wurde durch NADPH gestartet, die Ansätze für 60 min inkubiert und die Reaktion mit 20 µl 10 %iger TCA (Sigma), die zu 35 µl der Reaktionslösung pipettiert wurden, gestoppt. Leerwerte wurden in gleicher Weise durchgeführt. Jedoch wurden die Ansätze auf Eis pipettiert und unmittelbar danach die TCA dazugegeben. Proben und Leerwerte wurden für 5 min bei 3000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 300 µl Glycinpuffer (0,1 M, pH 10,4, Merck) versetzt und die Intensität des Umbelliferons bei einer Excitation von 375 nm und einer Emission von 455 nm gemessen. Die Aktivität wurde mit Hilfe einer Umbelliferon (Sigma) Eichkurve ermittelt.

### 2.8 Bestimmung von pH- und Temperaturoptima, $V_{max}$ - und $k_m$ -Wert

Für die Bestimmung von pH- und Temperaturoptima,  $V_{max}$ - und  $k_m$ -Wert wurden die unter 2.8 aufgeführten Substratkonzentrationen sowie die pH-Werte der Puffer entsprechend geändert. Die Messung der Enzyme erfolgte jeweils im Leberhomogenat (10 000 g Überstand) von Forellen und Karpfen. Die Homogenate wurden hergestellt wie für die Mikrosomenpräparation beschrieben. UDP-Glucuronyl-Transferase wurde nur in der Mikrosomenfraktion von Forellen gemessen. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Reaktionsansätze sind im folgenden aufgeführt:

Enzym	Forelle	Karpfen
GPT	0,20 mg/ml	0,17 mg/ml
PEP-CK	0,20 mg/ml	0,17 mg/ml
NCR	0,20 mg/ml	0,17 mg/ml
GST	0,020 mg/ml	0,017 mg/ml
ECOD	0,19 mg/ml	0,16 mg/ml
EROD	2,1 mg/ml	1,8 mg/ml
UGT	0,29 mg/ml (Mikrosomen)	-

Die Berechnung von  $k_m$ - und  $V_{max}$ -Werten erfolgte mit dem Programm Enzfitter 1.05 (Elsevier Biosoft, Cambridge, UK)

### 2.9 Präparation monoklonaler Antikörper

Die Präparation monoklonaler Antikörper gegen Regenbogenforellen CYP1A1 wurde von Frau Dr. I. Behn, Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Institut für Immunbiologie/Zoologie durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode kann bei (Behn & Fiebig, 1984; Behn et al., 1984) nachgelesen werden.

100 bis 200  $\mu$ g des Detergens-freien Antigens wurden in 200  $\mu$ l PBS gelöst und intraperitoneal in BALB/c Mäuse injiziert. Vier solcher Injektionen pro Tier wurden innerhalb von 16 Wochen vorgenommen. Die letzte Injektion wurde 4 Tage vor der Fusionierung der Zellen gegeben. Syngene Peritonealmakrophagen wurden unter Zuhilfenahme von 50 % Polyethylenglycol (MG 4000) mit Myelomazellen in RPMI 1640 (Biochrom) fusioniert. Da die Myelomazellen einen Defekt im HGPTR (Hypoxanthin Guaninphosphoribosyltransferase)-Gen besaßen, konnten fusionierte Zellen mit einem Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Selektion, nach Littlefield (1964)) enthielt, selektiert werden. Klone, die einen Antikörper gegen CYP1A1 produzierten, wurden mit einem ELISA mit CYP1A1 als Antigen identifiziert.

Der Antikörper-Subtyp wurde mit dem Maus-Hybridoma-Subtyp-Kit von Boehringer bestimmt.

Zur Untersuchung der Inhibition von EROD durch die Antikörper wurden diese zunächst mit einer Protein G Säule (Mab trap kit, 17/11 2801, Pharmacia) gereinigt, um den Einfluß von Proteinen aus dem Hybridoma-Kulturüberstand zu beseitigen. Mikrosomales Protein (4-400  $\mu$ g/ml) aus Lebern von induzierten und Kontrolltieren wurde mit dem gleichen Volumen einer gereinigten Antikörperlösung (10-30  $\mu$ g Protein/ml) versetzt und für 30 min inkubiert. Nach 30 min wurde die EROD-Aktivität der Mikrosomen/Antikörperlösung gemessen. Als unspezifische Kontrolle diente ein Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenproteine (zur Verfügung gestellt von Dr. I. Behn).

## 2.10 Kultur von Zelllinien

Vier verschiedene Fischzelllinien, ursprünglich aus der Regenbogenforelle und dem Karpfen isoliert, wurden für die Untersuchung der Biotransformationskapazität und in Kokultorexperimenten eingesetzt.

Die R1 Zelllinie wurde von Ahne (1985) aus der Leber der Regenbogenforelle isoliert und über die Firma Biochrom bezogen.

RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle (Wolf & Quimby, 1962) und RTH-149 (1960 zum ersten Mal aus einem Leberhepatom der Regenbogenforelle isoliert und zuerst beschrieben 1981 von Fryer et al. (1981)) waren bei ATCC (American Type Culture Collection) erhältlich.

EPC, eine Karpfenepithelzelllinie, wurde von ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Herkunft: Am. Virol. Inst. Pasteur 1983; 134: 207) bezogen.

Alle Zelllinien wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Arbeiten erfolgten unter Sterilbedingungen an einer sterilen Werkbank. Die Subkultivierung erfolgte einmal wöchentlich in einer Verdünnung von 1:2. Als Zellkulturmedium wurde EMEM (Biochrom), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum, 680  $\mu$ M Glutamin und 3,3 mg/ml Gentamycin, verwendet. Die Inkubation erfolgte in 15 ml Medium in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen bei 19°C.

Konfluente Zellkulturen wurden mit zweimal 10 ml sterilem und Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,5 ml/Kulturflasche Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) wurden die Zellen 2-10 min - bis sie sich vom Boden der Kulturflasche abgelöst hatten - inkubiert. Die Trypsinaktivität wurde sodann durch 5 ml Medium inaktiviert und die erhaltene Zellsuspension bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium durch Mischen auf einem Vortex-Schüttler resuspendiert und der Zelltiter in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die folgenden Schritte hingen davon ab, ob die Zellen für die routinemäßige Subkultivierung oder für Kokultorexperimente eingesetzt werden sollten.

Für die Subkultivierung wurden Zellen, die aus einer konfluenten Kulturflasche stammten in insgesamt 30 ml Medium resuspendiert und in zwei Kulturflaschen á 15 ml Medium ausgesät.

Für Kokultorexperimente wurden Zellen, die aus einer konfluenten Kulturflasche stammten, in neun 20 cm<sup>2</sup> großen Kulturschalen (Primaria, Falcon) ausgesät, so daß sich in jeder Schale 5 ml Zellsuspension befanden. Die Inkubation erfolgte bei 15°C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach einem Tag wurde das Medium durch eine Leberzellsuspension ersetzt. In Kontrollschalen wurde das Medium durch Serum-freies EMEM ersetzt.

## 2.11 Isolierung und Kultur von Leberzellen

### 2.11.1 Primärkultur von Hepatozyten der Regenbogenforellen

Die Isolation und Kultur der Leberzellen wurde nach Beschreibungen von Braunbeck (1993) und Sumpter & Jobling (1995) durchgeführt.

Eine 200-300 g schwere Regenbogenforelle wurde durch eine Überdosis Benzocain (4 g/l) getötet, mit 70 % Ethanol eingesprüht und auf eine Präparierschale in einer sterilen Werkbank gebettet. Die Forelle wurde ventral vom After in Richtung Kiemendeckel und seitlich vorsichtig, ohne Verletzung innerer Organe mit einer Präparierschere aufgeschnitten, so daß Leber und Perikard gut erreichbar waren. Nach dem Entfernen verschiedener Mesenterien und der Verschiebung des Pylorus wurde eine Flügelkanüle (0,65 mm  $\varnothing$ ) in die Leberpfortader eingeführt und mit Hilfe einer kleinen Arterienklemme fixiert. Die Leber wurde sodann mit Präperfusionslösung für 20 min bei einer Flußrate von 4 ml/min zur

Entfernung des Bluts gespült. Zur Vermeidung eines hydrostatischen Drucks wurde das Herz aufgeschnitten. Nach 20 min war die Leber vollständig entfärbt und die Perfusion wurde mit Perfusionslösung (0,02 % Collagen) für 10 min fortgesetzt. Die Leber wurde aus der Körperhöhle freipräpariert mit einer Arterienklemme in einem Stativ aufgehängt und für weitere 20 min im Kreislauf mit Perfusionslösung (0,02 % Collagen) durchspült.

Alle folgenden Schritte wurden unter Kühlung mit Eis durchgeführt. Die Leber wurde nach beendeter Perfusion in 10 ml Waschlösung gespült. Nach Entfernung der Gallenblase (ohne diese zu beschädigen) wurde die Leber in kleine Stücke geschnitten und durch 250 µm Gaze mit Hilfe eines Glasstabs gedrückt. Die Gaze wurde jeweils mit 10 ml Waschlösung nachgespült. Zur weiteren Vereinzelung der Leberzellen wurde die Suspension noch über eine 105 µm und eine 52 µm Gaze gefiltert.

Die Zellsuspension wurde mit Waschlösung auf 60 ml ergänzt und 3 mal bei 50 g für 3 min zentrifugiert und mit Waschlösung wieder resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 50 ml HMEM (Hanks buffered minimal essential medium, Biochrom Berlin), supplementiert mit 2 mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Steptomycin, resuspendiert und bis zur Aussaat auf Eis gekühlt.

Der Zelltitel wurde bestimmt und die Suspension auf  $1,6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Pro 20 cm<sup>2</sup> Kulturschale (Primaria, Falcon) wurden 5 ml Zellsuspension ausgebracht und die Schalen bei 15°C und 80 % relativer Luftfeuchte bis zu 8 Tage inkubiert. Ein kompletter Austausch des Mediums erfolgte alle 24 h.

#### 2.11.2 Primärkultur von Hepatozyten des Speisekarpfens (*Cyprinus carpio*)

Die Kultur von Karpfenhepatozyten wurde von Dr. R. Böhm, Universität Karlsruhe nach Isolation der Hepatozyten durch *in situ*-Collagenase-Perfusion nach einer Vorschrift von Segner et al. (1993) durchgeführt.

### 2.12 Modifizierung der Kulturbedingungen von isolierten Forellenhepatocysten

Um den Einfluß auf die Vitalität und die Expression verschiedener Biotransformationsenzyme zu untersuchen, wurden verschiedene Modifikationen bei der Kultur der Leberzellen vorgenommen.

#### 2.12.1 Beschichtung der Kulturschalen mit Collagen Typ I

Eine 0,1 %ige Stammlösung von Collagen Typ I (Sigma) in 0,1 M Essigsäure wurde durch vorsichtiges Rühren für 3 h hergestellt. Diese Stammlösung wurde 10fach verdünnt und mit Chloroform versetzt, so daß die Chloroformmenge maximal 10 % des Gesamtvolumens entsprach. Die Chloroform/Collagen-Lösung wurde über Nacht ohne zu Rühren bei 4°C aufbewahrt. Die obere Phase, welche das Collagen enthielt, wurde zu Beschichtung von 20 cm<sup>2</sup> Kulturschalen (Primaria, Falcon) eingesetzt. Die Menge betrug 6 µg/cm<sup>2</sup>. Die Kulturschalen wurden für einige Stunden bei 37°C mit der Collagenlösung inkubiert und dann in einer sterilen Werkbank unter UV-Licht getrocknet. Vor dem Ausbringen einer Zellsuspension wurden die Schalen mit sterilem PBS (2 x 10 ml) gewaschen.

#### 2.12.2 Zusatz von Hormonen und Kofaktoren zum Medium

In den Supplementierungsversuchen wurde das Kulturmedium mit folgenden Konzentrationen von Hormonen bzw. Kofaktoren u.a. versetzt: 10 nM Insulin, 10 nM Cortisol, 5 µg/ml Transferrin, 100 µM 5-Aminolevulinsäure

## 2. Material und Methoden

### 2.12.3 Kokultur von Hepatocyten mit verschiedenen Fischzelllinien

Drei verschiedene Fischzelllinien wurden für die Kokulturrexperimente verwendet: R1, RTG-2 und RTH-149. Die Zelllinien wurden ein oder zwei Tage vor der Isolierung der Leberzellen ausgesät (siehe Abschnitt 2.10 *Kultur von Zelllinien*). Vor dem Ausbringen der Leberzellen wurde das alte Medium entfernt und durch die Leberzellsuspension bzw. in Kontrolleexperimenten durch Serum-freies Medium ersetzt.

### 2.13 Präparation der Zellkulturhomogenate

Leberzellen und Zelllinien wurden mit einem Schaber von den Kulturflaschen oder aus den Kulturschalen herausgelöst und in 300 µl PBS/8 x 10<sup>6</sup> Zellen (das entspricht der Menge Leberzellen pro 20 cm<sup>2</sup> Kulturschale) resuspendiert. Die Suspension wurde für 3 min bei 200 g zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Homogenisation der Proben erfolgte mit einem Ultraschallstab durch Impulse von 20 mal 1 sec unter Eiskühlung. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bei -80°C gelagert. Für die Analyse von Enzymaktivitäten, Cytochrom P450- und Proteinkonzentration wurden die Proben aufgetaut, bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert und Aktivität und Konzentration aus dem Überstand bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde im Homogenat vor der 10 000 g Zentrifugation gemessen.

### 2.14 Induktion von CYP1A1 in Leberzellkulturen

Die Induktorsubstanzen (β-Naphtoflavon, Benzo(a)pyren, Benzanthracen oder Methylcholanthren (Sigma, Aldrich) wurden in 1000facher Konzentration in DMSO gelöst und zur Anwendung in der Zellkultur entsprechend 1:1000 mit Medium verdünnt. Konzentrationsbereiche von 3-8000 nM wurden getestet. Die Hepatocyten wurden zunächst in Medium ohne Induktor ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen Induktionsmedium bzw. Kontrollmedium (0,1 % DMSO) ausgetauscht. Die Zellen wurden weitere 2 bzw. 4 Tage kultiviert und das Medium alle 24 h gegen frisches Induktionsmedium ausgetauscht.

Alle Versuche zur Aufstellung von Konzentrations-Wirkungskurven für die Induktion von CYP1A1 in Leberzellen wurden in RTG-Kokulturen durchgeführt. Zur Verbesserung der Anheftung wurden die Leberzellen hier außerdem im Serum-haltigem Medium (10 % fötales Kälberserum) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Serum-freies Induktions- bzw. Kontrollmedium ausgetauscht. Die Kontrollmedien enthielten auch hier 0,1 % DMSO.

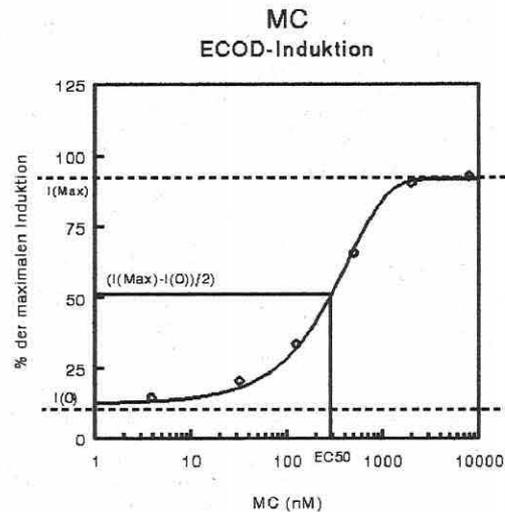
### 2.15 Berechnung von EC<sub>50</sub> und maximaler induzierter Aktivität (bzw. CYP1A1-Konzentration)

EC<sub>50</sub> und maximaler Aktivität wurden durch Approximation einer sigmoiden Kurve an die Meßwerte berechnet. Der Kurvenverlauf wurde durch folgende Formel beschrieben:

$$y = a_0 + \frac{a_1}{1 + e^{\left(\frac{x-a_2}{a_3}\right)}}$$

Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SlideWrite Plus 6.00 (Advanced Graphics Software, Carlsbad, USA), das die Konstanten a<sub>0</sub> - a<sub>3</sub> iterativ bis zur bestmöglichen Annäherung an die Meßwerte bestimmte.

Der maximale Induktionswert war dabei der Grenzwert von  $y$  bei  $x \rightarrow \infty$ . Der  $EC_{50}$ -Wert konnte nicht einfach aus der halben maximalen Induktion ermittelt werden, da die  $I(0)$ -Werte in der Regel von 0 verschieden waren. Der  $EC_{50}$ -Wert ergab sich daher aus der Konzentration beim  $y$ -Wert  $(I(\text{Max}) - I(0))/2$ . Zur Veranschaulichung sind  $EC_{50}$ ,  $I(\text{Max})$  und  $I(0)$  im nachfolgenden Diagramm am Beispiel der Induktion von ECOD durch Methylcholanthren (MC) in 2 Tage inkubierten Hepatocyten der Regenbogenforelle dargestellt:



### 2.16 Messung der Induktionskapazität für CYP1A1 von Umweltproben

Eluate einer Halde vom Abbau von Kupferschiefer-Mergel aus dem Mansfelder Raum bei Halle wurden auf ihre Induktionskapazität für CYP1A1 in Leberzellkulturen geprüft. Der Kupferschiefer-Mergel enthielt einen hohen Anteil Bitumen natürlichen Ursprungs. Die Elution von Deponieproben wurde von Dr. A. Paschke, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle-GmbH, Sektion Chemische Ökotoxikologie durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst mechanisch zerkleinert und dann je 100 g Feststoff mit 1000 ml destilliertem Wasser 24 h in einem 2-l-Polyethylengefäß auf einem Schüttler bei 3 Umdrehungen/min bewegt. Die Feststoffe wurden vom Eluat durch Zentrifugation abgetrennt und das Eluat bei 4°C gelagert. Die Analyse polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe wurde von Dr. Popp, UFZ-Sektion Analytik mit Toluol-Extraktion durchgeführt.

Die Eluate, die auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurden, wurden 1:2 mit doppelt konzentriertem HMEM Medium verdünnt. 24 h nach der Aussaat von Hepatocyten in RTG-Kokulturen wurde das Medium durch Eluat/HMEM Medium ersetzt und alle 24 h erneuert.

### 2.17 Western Blotting und Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der Proben wurden diese zunächst im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und durch 3 min Kochen denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 10 %igen Polyacrylamid/SDS Minigelen (8 x 10 cm) bei einem konstanten Strom von 16

## 2. Material und Methoden

und 25 mA pro Gel innerhalb von 60 min. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und dann durch mehrmaliges Inkubieren in Entfärbelösung entfärbt.

Sollten die Proben auf Nitrocellulose geblottet werden, wurde keine Coomassie-Färbung durchgeführt. Gel und Nitrocellulose wurden im Towbin-Puffer für 30 min equilibriert. Die Gele wurden auf die Nitrocellulose aufgelegt und in einer Naß-Blotkammer mit 5 l Towbin-Puffer bei einem konstanten Stromfluß von 1 A für 5 h inkubiert, bis die Proteine quantitativ auf die Nitrocellulose übertragen waren.

Die transferierten Proteine konnten durch eine Fast Green Färbung nachgewiesen werden. Dazu wurde die Nitrocellulose in Fast-Green-Färbelösung für 5 min inkubiert und dann mehrfach bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Aqua dest. gewaschen. Die Lage der Banden konnte dauerhaft mit Kugelschreiber auf der Nitrocellulose markiert werden. Eine vollständige Entfärbung wurde durch 5 min Inkubation in 0,2 N NaOH erreicht. Die NaOH wurde durch Aqua dest. ausgewaschen und die Nitrocellulose anschließend für 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert. Nach dem Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen wurde 2 mal in Waschlösung und 2 mal in PBS für je 5-10 min gewaschen. Die Verdünnung des Antikörpers hing davon ab, ob Zellkulturüberstände von Hybridomakulturen oder kommerzielle gereinigte Antikörper verwendet wurden. Zellkulturüberstände der CYP1A1-Antikörper positiven Klone wurden 1:10 in Blocklösung verdünnt. Mouse Anti-Cod CYP1A1 IgG Mab NP7 (1 mg/ml; Miljø Laboratories, Bergen, Norwegen) wurde nach der beigefügten Vorschrift 1:500 in PBS bis 1:10 in PBS verdünnt. Die Nitrocellulose wurde 1 h mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und dann 4 mal für 5-10 min mit PBS gewaschen. Der konjugierte Antikörper (Ziege-Anti-Maus, Dako, Hamburg) wurde 1:500 mit PBS verdünnt und für 1 h mit der Nitrocellulose inkubiert. Nach weiteren 4 PBS-Waschschritten erfolgte die Inkubation in der Peroxidase-Färbelösung. Spezifisch angefärbte Proteinbanden wurden nach 5-30 min sichtbar. Die gefärbte Nitrocellulose konnte in getrocknetem Zustand aufbewahrt werden.

### 2.18 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Es wurden zwei verschiedene Verfahren für den ELISA angewendet. Im *direkten ELISA* wurden Mikrotiterplatten in entsprechender Konzentration mit dem Probenprotein inkubiert und dann mit spezifischem und konjugierten Antikörper nachgewiesen. D.h. bei einer Anfärbung war die Menge des in der Probe enthaltenen Antigens proportional zur Extinktion.

Im *kompetitiven ELISA* wurden die Proben zunächst mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und dann auf eine mit gereinigtem Antigen vorbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben. D.h. je höher der Gehalt der Probe an spezifischem Antikörper war, desto weniger Antikörper konnten an die mit Antigen vorbeschichteten Platten binden und desto geringer war die Farbreaktion.

#### 2.18.1 Direkter ELISA

Homogenat (10 000 g Überstand) und Mikrosomen wurden mit Beschichtungspuffer (50 mM Na-Hydrogencarbonat, pH 9,5) auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Standard Konzentrationen zwischen 5 und 60 µg/ml gereinigtes P4501A1 in Beschichtungspuffer wurden vorbereitet. Pro Kavität einer Mikrotiterplatte wurden 100 µl der Proben- und Standardlösungen (3fach Bestimmungen) pipettiert. Die Platten wurden bei 4°C bei ausreichender Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert.

Nach 3maligem Waschen mit 200 µl 0,1 % Tween20 in PBS wurden die Platten für 1-2 h in Blocklösung inkubiert (200 µl 1 % BSA in PBS pro Kavität). Die Platten wurden nochmals 3

mal mit Tween 20 in PBS gewaschen und dann für 1-2 h in einer verdünnten Lösung des spezifischen Antikörpers inkubiert (100 µl pro Kavität). Zellkulturüberstände aus Hybridomazellkulturen wurden wie im Western Blot 1:10 mit PBS verdünnt. Der gereinigte Mouse-Anti-Cod-CYP1A1-IgG-Mab NP7 (Miljø Laboratories, Bergen, Norwegen) wurde 1:500 bis 1:10 mit PBS verdünnt. Nach weiteren 3 Waschstritten wurde mit einer 1:500 in PBS verdünnten Lösung des 2. Antikörpers für 1-2 h inkubiert (100 µl pro Kavität).

Bevor die Peroxidase des konjugierten Antikörpers nachgewiesen wurde, wurde nochmals 3 mal gewaschen und dann für 30-60 min in der ABTS Lösung inkubiert. Die Konzentration wurde über die Färbung des durch die Peroxidase-Aktivität entstandenen ABTS-Abbauprodukts bestimmt. Gemessen wurde in einem SLT Spectra Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm.

Der pH wurde mit Essigsäure auf 4,2 eingestellt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sollte erst unmittelbar vor Reaktionsbeginn zugesetzt werden. Pro Kavität wurden 100 µl ABTS-Lösung benötigt.

Die Inkubation der Mikrotiterplatten mit der ABTS-Lösung muß unbedingt im Dunkeln erfolgen, da sonst bereits eine Anfärbung nur durch die Reaktion von ABTS unter Lichteinwirkung erfolgt.

### 2.18.2 Kompetitiver ELISA

Im kompetitiven ELISA wurden die Mikrotiterplatten zunächst mit 100 µl pro Kavität 0,1 µg/ml gereinigtem CYP1A1 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden dann wie im direkten ELISA gewaschen und geblockt. Der spezifische Antikörper aus dem Zellkulturüberstand der Hybridomakulturen wurde 1:10 mit PBS verdünnt und mit einem gleich großen Volumen einer Homogenat-, Mikrosomenprobe oder einer Standard-CYP1A1-Konzentration versetzt (Gesamtvolumen 400 µl) und für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischungen wurden dann auf die Mikrotiterplatten pipettiert (100 µl pro Kavität, 3fach Bestimmungen). Nach dem Waschen und einer Inkubation mit 100 µl des 1:500 verdünnten konjugierten Antikörpers wurden die Platten mit ABTS-Lösung inkubiert (siehe Beschreibung direkter ELISA).

### 2.19 Statistik

Die Fehlerhäufigkeit bzw. Streuung der Meßwerte wurde durch Berechnung der Standardabweichung oder des Standardfehlers veranschaulicht. Die Standardabweichung wurde zur Darstellung von Streuungen innerhalb eines Versuchs herangezogen. Wurden die Mittelwerte aus den Mittelwerten mehrerer unabhängiger Experimente (z.B. verschiedener Zellisolationen) berechnet, so wurde die Genauigkeit der Messung durch den Standardfehler ausgedrückt (Sachs, 1992a). Standardabweichung  $s$  und Standardfehler  $s_x$  berechneten sich nach folgenden Formeln:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

$$s_x = \frac{s_D}{\sqrt{n}}$$

mit  $x$ =Meßwerte und  $n$ =Anzahl der Stichproben. In Ausnahmefällen wurde statt der Standardabweichung bei Mittelwerten aus Meßwerten innerhalb eines Experimentes der Standardfehler dargestellt. In diesem Fall waren die Standardabweichungen sehr hoch und hätten daher eine übersichtliche Darstellung der Meßergebnisse in Diagrammen nicht möglich gemacht.

## 2. Material und Methoden

Für die Signifikanzanalyse wurde angenommen, daß die zugrunde liegenden Meßwerte angenähert t-verteilt sind. Dann können Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben mit Hilfe des t-Tests berechnet werden (Köhler et al., 1992).

Als Vertrauensbereich wurde in der Regel  $\alpha=5\%$  gewählt, d.h. bei Ablehnung der Hypothese  $\mu_1=\mu_2$  gehörten die Mittelwerte mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit zwei verschiedenen Grundgesamtheiten an. In Ausnahmefällen wurde  $\alpha=20\%$  gewählt. Die Hypothese  $\mu_1=\mu_2$  wurde abgelehnt aufgrund des Vergleiches der t-Werte und zwar wenn  $t_{\text{Versuch}} > t_{\text{Tabelle}}$ . Die tabellierten t-Werte wurden den gebräuchlichen t-Tabellen für den zweiseitigen Test entnommen, z.B. aus Sachs (1992b). Die Berechnung der  $t_{\text{Versuch}}$ -Werte erfolgte nach folgender Formel:

$$t_{\text{Vers}} = \frac{|\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2|}{s_D} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$s_D = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_{\mu_1}^2 + (n_2 - 1)s_{\mu_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$FG = n_1 + n_2 - 2$$

Dabei sind FG die Freiheitsgrade und  $n_1$ ,  $n_2$  die Stichprobenumfänge der zu vergleichenden Mittelwerte  $\mu_1$  und  $\mu_2$  mit den dazugehörigen Standardabweichungen  $s_{\mu_1}$  und  $s_{\mu_2}$ .

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1 und zur Durchführung von Induktionsstudien in Primärzellkulturen von Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

#### 3.1 Zusammenfassung

Regenbogenforellen wurden mit BNF ( $\beta$ -Naphthoflavon) injiziert, um die Neusynthese von CYP1A1 (Cytochrom P4501A1) auszulösen. Das CYP1A1 Isoenzym wurde aus der Mikrosomenfraktion der Leber von induzierten Fischen gereinigt und für die Präparation eines monoklonalen Antikörpers in BALB/c Mäusen verwendet. Die Spezifität des Antikörpers für CYP1A1 wurde durch Western Blot und ELISA überprüft. Der Antikörper war in der Lage die Induktion von CYP1A1 in Regenbogenforellen *in vivo* und Primärkulturen von Forellenhepatocyten *in vitro* zu demonstrieren. Ein ELISA-Test für den semiquantitativen Nachweis von CYP1A1 wurde entwickelt.

#### 3.2 Einleitung

Wie die Säugetiere besitzen auch die Fische ein Cytochrom P450-System, das am Metabolismus exogener und endogener Verbindungen (z.B. Steroide) beteiligt ist (Goksøyr & Förlin, 1992; Kleinow et al., 1987; Stegeman, 1989; Stegeman et al., 1990). Der Metabolismus über Cytochrom P450-Monooxygenasen ist dabei ein wichtiger Faktor, der über die Aktivierung oder die Detoxifizierung von Medikamenten und organischen Fremdstoffen entscheidet (Beresford, 1993; Goldstein & Faletto, 1993; Ingelman-Sundberg, 1980; Parke, 1987). Die Funktion und Regulation dieser Proteine hat Einfluß auf unterschiedliche Empfindlichkeit und toxische Wirkweise von Chemikalien bei verschiedenen Spezies (Bend & James, 1978; Braunbeck & Voelkl, 1991; Goksøyr et al., 1987; Kleinow et al., 1987; Ueng et al., 1992) und kann die Bioakkumulation der entsprechenden Substanz beeinflussen (de Bruijn et al., 1993; Lech & Bend, 1980; Sijm et al., 1993a, b; Streit, 1992).

Exposition von Fischen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (HAHs) führt zu einer Induktion eines bestimmten Isoenzym, dem CYP1A1 (Andersson et al., 1985; Gooch et al., 1989; Haasch et al., 1993b; Hermens et al., 1990; Leaver et al., 1988; Lemaire et al., 1992a; Lindström-Seppä et al., 1994; van der Weiden et al., 1992, 1993a, b; Zhang et al., 1990). Planare PAHs - oder solche, die eine planare Konfiguration einnehmen können - binden an ein intrazelluläres zytosolisches Protein, den sogenannten Ah-Rezeptor. Dieser Ligandenkomplex wird an ein zweites Protein, das Arnt-Protein (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), gekoppelt und in den Kern transportiert, wo es mit bestimmten DNA-Elementen, welche als XRE (Xenobiotic Responsive Elements) bezeichnet werden, interagiert. Eines dieser XRE-Elemente liegt in der Promotorregion des CYP1A1-Gens und aktiviert dessen Transkription bei Bindung des Ah-Rezeptor-Liganden-Komplexes. In der Folge kommt es zu einer Erhöhung der CYP1A1-Konzentration in der Zelle, die sich in einem Anstieg der entsprechenden Enzymmenge und damit der Enzymaktivitäten niederschlägt (Beresford, 1993; Bock, 1993; Poland & Knutson, 1982).

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

Für den Nachweis der Induktion der CYP1A1 Monooxygenase-Aktivität existieren verschiedenen Methoden. Neben katalytischen Meßmethoden zum Nachweis der Aktivität, die die oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin oder 7-Ethoxycoumarin ausnutzen, werden auch spezifische Antikörper für die Detektion des CYP1A1-Proteins oder die Hybridisation mit einer cDNA zum Nachweis einer angestiegenen CYP1A1-mRNA-Synthese verwendet. Die Messung der Induktion von CYP1A1 allein durch seine katalytische Enzymaktivität kann aber zu mißverständlichen Ergebnissen führen, da der postmikrosomale Überstand von Regenbogenforellenleber eine Aktivitäts-inhibierende Substanz enthält (Achazi et al., 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß einige PCB-Kongenere die EROD-Aktivität inhibieren, auch wenn die Menge des CYP1A1 Proteins durch Sie erhöht wurde (Boon et al., 1992; Goksøyr et al., 1991b; Gooch et al., 1989). Diese Tatsache und die Empfindlichkeit katalytischer Nachweismethoden gegenüber den Aufbewahrungsbedingungen der zu untersuchenden Proben hat verschiedene Forschergruppen dazu veranlaßt, eine immunologisch-chemische Nachweismethode auf der Basis von Antikörpern zu entwickeln (Goksøyr et al., 1988, 1991a, b; Myers et al., 1993; Park et al., 1986; Ronis et al., 1992; Stegeman et al., 1987).

Die besonderen Eigenschaften des CYP1A1 - seine Induzierbarkeit als Folge einer Chemikalienexposition - wurde für den routinemäßigen Einsatz als sensitiver, früher Indikator (Biomarker) der PAH-Belastung von Fischen eingesetzt (Collier et al., 1992; Förlin & Celander, 1993; Förlin et al., 1992; Goksøyr, 1991; Goksøyr & Förlin, 1992; Goksøyr & Husoy, 1993; Goksøyr et al., 1988, 1991b; Haasch et al., 1993a; Otto et al., 1994; Pluta, 1992b; Ronis et al., 1992; Stegeman et al., 1986, 1987, 1988). Problematisch bei diesem Ansatz ist aber, daß die CYP1A1-Menge und -Aktivität nicht nur durch Kontamination von Wasser und Nahrung durch Chemikalien beeinflusst werden, sondern auch durch endogene Faktoren wie Hormone oder exogene wie z.B. Temperatur kontrolliert werden (Elskus et al., 1992; Kleinow et al., 1987; Lange, U. et al., 1994). Die Durchführung von Expositionsexperimenten in Leberzellkulturen würde diese Faktoren vermindern und die Kontrollierbarkeit der experimentellen Bedingungen verbessern.

Eine Vielzahl toxikologischer *in vitro*-Untersuchungen zu CYP1A1 ist bisher mit Hepatozyten aus Säugern durchgeführt worden. Die Interaktion zwischen Zellen, Dosis- und Zeitabhängigkeit sowie der Einfluß verschiedener Faktoren wurde untersucht (Blaauboer et al., 1994; Chenery, 1987; Rogiers & Vercruysse, 1993; Scheepers et al., 1991). In den letzten Jahren wurde auch für Primärzellkulturen von Fischhepatozyten - insbesondere für Hepatozyten aus der Regenbogenforelle - die Induktion von CYP1A1 *in vitro* demonstriert (Devaux et al., 1991; Masfarau et al., 1992a, b; Miller et al., 1989; Vaillant et al., 1989). Eine von Lindström-Seppä et al. (1993) durchgeführte Untersuchung zeigt, daß Fischhepatozyten zum Nachweis einer Kontamination von Flüssen und Abwasserzuläufen mit PAHs - im genannten Beispiel mit Abwässern von Papiermühlen - eingesetzt werden können.

Ziel der Untersuchungen in diesem Kapitel war es, eine immunochemische Nachweismethode für CYP1A1 der Forelle zu entwickeln. Gegenüber der katalytischen EROD-Messung böte dieser Ansatz den Vorteil, daß er

1. nicht sensibel gegen die Enzymaktivität inhibierende Stoffe wäre,
2. eine Messung bereits bei kleinen Proteinmengen möglich wäre (in einem ELISA sind weniger als 10 µg Protein pro Probe erforderlich !), und
3. unempfindlich gegenüber Lagerungsbedingungen (Einfrieren, Auftauen) wäre.

Zu diesem Zweck wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CYP1A1 aus der Regenbogenforelle präpariert. Außerdem ist dies - nach meinem gegenwärtigen Kenntnisstand - die erste Untersuchung, die die Verwendung von Primärzellkulturen von Fischhepatozyten aus nicht induzierten Tieren mit dem immunochemischen Nachweis von CYP1A1 kombiniert.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Präparation der Mikrosomenfraktion

Um eine ausreichende Menge Protein für die Reinigung von CYP1A1 und der anschließenden Präparation des monoklonalen Antikörpers zu erhalten, wurden insgesamt 56 Regenbogenforellen mit 25 mg BNF/kg Körpergewicht induziert. Die Lebern von je 4 bis 9 Tieren in 9 verschiedenen Präparationen wurden gemeinsam aufgearbeitet. Dabei mußten zunächst verschiedene Zentrifugationsschritte durchgeführt werden, um die mikrosomale Fraktion zu erhalten, bevor mit der Solubilisierung und der Reinigung über verschiedene Säulensysteme begonnen werden konnte. Nach jedem Präparationsschritt wurden routinemäßig verschiedene biochemische Parameter gemessen, insbesondere die Enzymaktivitäten von Phase 1- und Phase 2-Biotransformationsenzymen.

Es zeigte sich, daß die mit BNF injizierten Tiere eine signifikant erhöhte EROD-Aktivität aufwiesen. Während die EROD-Aktivität in Homogenaten von Kontrolltieren bei 14 pmol/min/mg Protein lag, stieg sie in induzierten Tieren auf 240 bis 380 pmol/min/mg Protein an. Die Aktivitäten in der Mikrosomenfraktion waren noch höher, angefangen bei 20 pmol/min/mg Protein in Kontrolltieren bis zu 2,92 nmol/min/mg Protein in BNF-induzierten Forellen. Niedrigere Aktivitäten, jedoch eine stark erhöhte Aktivität in induzierten Tieren, konnten für ECOD gefunden werden. Für die NADPH-Cytochrom c(P450)-Reduktase (NCR) konnte weder eine eindeutige Zu- noch Abnahme der Enzymaktivität festgestellt werden. Die Ergebnisse aus den einzelnen Präparationen sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Sie zeigen auffällig hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Präparationen, obwohl diese bereits auf gemittelten Werten basieren, da jeweils bis zu 9 Lebern gemeinsam präpariert wurden. Um die Schwankung zwischen einzelnen Tieren zu demonstrieren und um den Einfluß der BNF-Injektion auf die Phase 2-Enzyme Glutathion-S-Transferase (GST) und UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) zu zeigen, wurden bei jeweils 3 Tieren die Lebern getrennt aufgearbeitet. Wie aus den in Tab. 3.1 dargestellten Ergebnissen bereits zu erwarten war, waren zwischen den einzelnen Individuen hohe Schwankungen zu beobachten, die in einer hohen Standardabweichung resultierten. Die Schwankungen bei den beiden Phase 2-Enzymen fielen dabei etwas geringer aus. Aber auch hier konnte eine Zunahme der Aktivität in BNF-injizierten Tieren festgestellt werden. Während die UGT nur eine geringe Zunahme zeigte, war die GST dagegen, um über das doppelte erhöht (siehe Abb. 3.1).

Bezüglich der Zellkompartimentierung zeigte sich eine eindeutige Lokalisation von NCR, EROD, ECOD und UGT in der mikrosomalen Fraktion, während die GST ihre maximalen Aktivitäten sowohl im Cytosol als auch im Homogenat aufwies. Relativ hohe Aktivitäten im Vergleich zur mikrosomalen Fraktion zeigte die ECOD im Homogenat und im 20 000 g Pellet. In der Abb. 3.2 ist nur die Kompartimentierung in der Leber von BNF-injizierten Forellen dargestellt. Prinzipiell ähnliche Ergebnisse wurden aber auch mit Kontrolltieren beobachtet, wobei im Durchschnitt niedrigere Enzymaktivitäten gemessen wurden. Wegen der höheren Standardabweichungen als Folge der relativ geringen Aktivitäten und aufgrund der ähnlichen Verteilung in den einzelnen Kompartimenten, wurden die Ergebnisse der Kontrolltiere in der Abb. 3.2 nicht dargestellt.

#### 3.3.2 Reinigung von CYP1A1

Eine Darstellung des CYP1A1-Isoenzym war zum erstenmal nach der Chromatographie über die DEAE-Toyopearl-Säule möglich (verschiedene Reinigungsschritte und deren Abfolge siehe Kapitel 2). Die Messung der Extinktion des Säuleneffluents bei 420 nm ergab mehrere Maxima im Chromatogramm. Eine stark erhöhte Absorption bei 420 nm wiesen die Fraktionen 90 bis 115 auf (Abb. 3.3). Die Absorption bei 420 nm war auf das CYP1A1-Iso-

# Mikrosomenpräparation

## Zusammenfassung der Meßergebnisse

	Präparation A	Präparation B	Präparation C	Präparation D	Präparation E	Präparation F	Präparation G	Präparation H	Präparation I	Kontrolle
Anzahl der Tiere	4	4	6	8	6	7	9	9	9	3
Körpergewicht (g)	274 +/- 16	261 +/- 14	255 +/- 23	269 +/- 22	263 +/- 34	265 +/- 26	261 +/- 17	294 +/- 309	309 +/- 26	280 +/- 14
Lebergewicht (g)	3,95 +/- 0,59	3,90 +/- 0,14	3,45 +/- 0,76	3,33 +/- 0,33	3,32 +/- 0,46	3,14 +/- 0,39	2,86 +/- 0,38	3,34 +/- 3,01	3,01 +/- 0,31	3,93 +/- 0,60
LSI (%)	1,45 +/- 0,26	1,50 +/- 0,11	1,34 +/- 0,21	1,24 +/- 0,14	1,26 +/- 0,02	1,19 +/- 0,13	1,09 +/- 0,14	1,13 +/- 0,98	0,98 +/- 0,06	1,40 +/- 0,21
Protein (mg/ml)										
Homogenat			35,12 +/- 2,69	28,64 +/- 3,76	37,61 +/- 3,15	27,51 +/- 2,95	20,17 +/- 2,25	27,54 +/- 7,23	27,17 +/- 7,23	26,77 +/- 4,79
Mikrosomen	28,76 +/- 11,10	20,49 +/- 0,95	18,11 +/- 0,81	11,54 +/- 1,46	22,81 +/- 7,93	12,54 +/- 5,10	23,73 +/- 5,88	14,78 +/- 5,35	12,83 +/- 5,35	19,74 +/- 3,23
EROD (nmol/mg/ml)										
Homogenat			0,30 +/- 0,01	0,38 +/- 0,02	0,24 +/- 0,00	0,07 +/- 0,23	0,13 +/- 0,06	0,08 +/- 0,01	0,07 +/- 0,02	0,01 +/- 0,01
Mikrosomen	0,42 +/- 0,06	1,84 +/- 0,3	2,92 +/- 0,09	2,29 +/- 0,04	1,80 +/- 0,09	0,90 +/- 0,00	0,96 +/- 0,57	1,46 +/- 0,10	1,69 +/- 0,23	0,02 +/- 0,01
ECOD (pmol/mg/ml)										
Homogenat			90 +/- 0	136 +/- 25	83 +/- 14	91 +/- 7	214 +/- 60	129 +/- 32	208 +/- 14	9,64 +/- 0,94
Mikrosomen	90 +/- 140	140 +/- 4	224 +/- 3	340 +/- 4	207 +/- 5	204 +/- 2	510 +/- 125	161 +/- 32	359 +/- 14	29,53 +/- 2,58
NCR (nmol/mg/ml)										
Homogenat			3,29 +/- 0,23	4,49 +/- 1,09	6,21 +/- 1,91	4,68 +/- 0,76	14,32 +/- 0,95	4,68 +/- 0,76	5,31 +/- 1,06	3,04 +/- 0,67
Mikrosomen	9,34 +/- 0,18	12,76 +/- 0,17	15,11 +/- 1,15	18,19 +/- 2,54	19,84 +/- 0,43	1,14 +/- 1,47	5,26 +/- 5,74	22,19 +/- 7,77	22,04 +/- 1,44	10,45 +/- 1,54

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Meßergebnisse aus der Mikrosomenpräparation. Alle Meßwerte sind Mittelwerte aus 3 Messungen +/- Standardabweichung. Der LSI=Lebersomatischer Index berechnete sich aus Leberfrischgewicht x 100 /Frischgewicht der Forelle. Tiere aus den Präparationen A-I wurden mit 25 mg/kg  $\beta$ -Naphthoflavin induziert. Kontrolltiere (rechte Spalte) wurden nicht induziert.

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

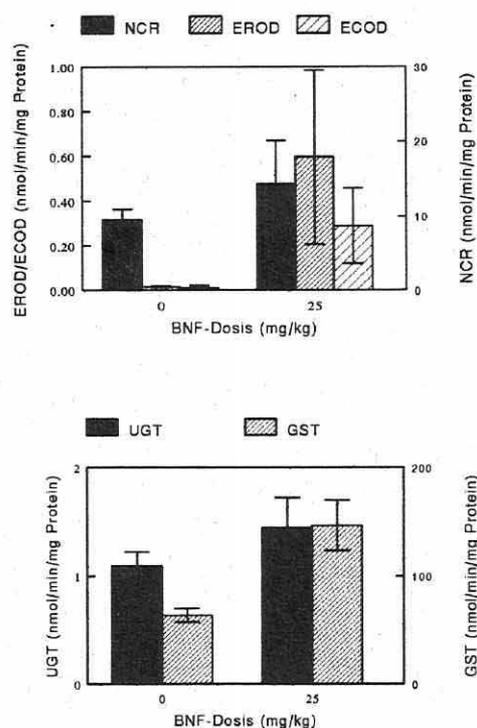


Abb. 3.1: Enzymaktivitäten verschiedener Phase 1- und Phase 2-Enzyme im Homogenat der Leber aus Regenbogenforellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 Lebern  $\pm$  Standardabweichung. Enzymaktivitäten in BNF-behandelten Tieren wurden 5 Tage nach der Injektion gemessen.

enzym zurückzuführen. Dies konnte durch Kreuzreaktivität mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ratten CYP1A1 und durch N-terminale Sequenzierung bestätigt werden. Die N-Terminus konnte mit (M)-L-V-M-I-L-P-I-I-G-S-V- angegeben werden (bestimmt von Dr. C. Otto, MDC, Berlin) und war damit identisch mit der von (Heilmann et al., 1988) für die Regenbogenforelle publizierten Aminosäuresequenz.

Die Ausbeute der einzelnen Reinigungsschritte betrug nach der Entfernung der für die Solubilisierung notwendigen Detergenzien nur noch 15 % der zu Beginn eingesetzten Menge an Cytochrom P450 (Tab. 3.2). Der spezifische Gehalt war dagegen mehr als 15fach erhöht. Beide Parameter - spezifischer Gehalt und prozentuale Ausbeute - wurden über die Bestimmung des Gesamt-P450-Gehaltes mit CO-Differenzspektren ermittelt.

Die Elektrophorese des gereinigten Proteins zeigte nur eine einzige Bande nach Anfärbung mit Coomassie Blue. Diese Bande lag zwischen den Banden der Molekulargewichtsmarker von 45 000 und 67 000 Da (Abb. 3.4).

#### 3.3.3 Präparation des monoklonalen Antikörpers

Nach der Injektion von gereinigtem Detergens-freiem CYP1A1 in Mäuse und der 16 Wochen später erfolgten Fusion von syngenem Peritonealmakrophagen mit Myeloma-Zellen (ausführliche Beschreibung siehe Kapitel 2) konnten zwei Hybridomklone identifiziert werden, die sowohl im ELISA als auch im Western Blot positiv mit gereinigtem CYP1A1 rea-

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

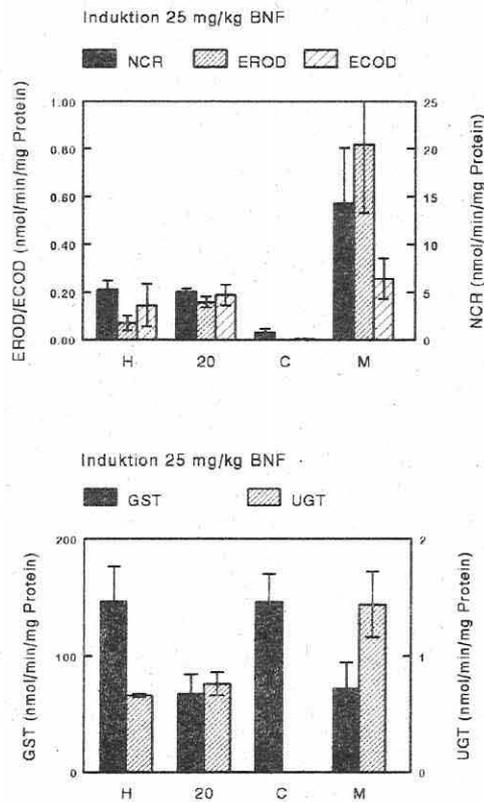


Abb. 3.2: Kompartimentierung verschiedener Phase 1- und Phase 2-Enzyme in der Leber von BNF-injizierten Regenbogenforellen. Die Aktivitäten wurden 5 Tage nach der Injektion bestimmt und repräsentieren Mittelwerte aus 3 Messungen  $\pm$  Standardabweichung. H=Homogenat, 20=20 000 g Pellet, C=Cytosol und M=Mikrosomenfraktion.

Reinigungsschritt	Spezifischer P450-Gehalt (nmol/mg Protein)	Ausbeute (Prozent des vorausgegangenen Schritts)
Leber Mikrosomen	1.01	-
Solubilisierung	1.1	90-95
$\omega$ -Amino-Octyl-Sepharose 4B	3.7	90
DEAE-Toyopearl	5.8	50
Hydroxylapatit	16.95	60-70

Tabelle 3.2: Ausbeute und spezifischer Gehalt von Cytochrom P450 nach den verschiedenen Reinigungsschritten. Die P450-Menge wurde spektrophotometrisch über CO-Differenzspektren bestimmt (Durchführung der Meßwerte und Erstellung der Tabelle von Dr. H. Honeck, MDC, Berlin)

### Chromatographie von CYP1A1 mit DEAE

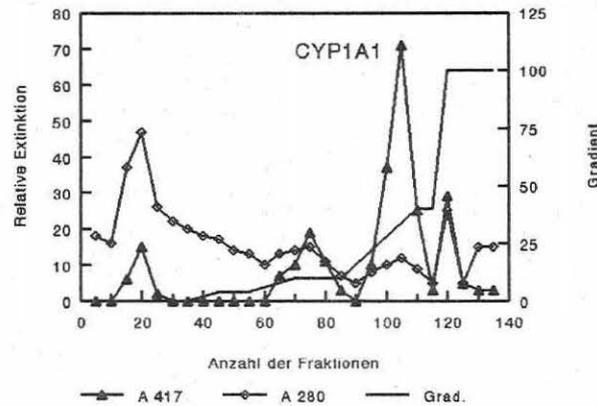


Abb. 3.3: Chromatogramm der CYP1A1-Reinigung über DEAE-Toyopearl 550. Fraktionen, die möglicherweise P450-Isoenzyme enthalten könnten, wurden über die Messung der Absorption bei 420 nm im Säuleneffluent identifiziert. Die Gesamtproteinmenge wurde über die Extinktion bei 280 nm ermittelt. Die CYP1A1 enthaltenden Fraktionen wurden über Western Blot mit Anti-Ratten-CYP1A1 und N-terminale Sequenzierung identifiziert. Die Elution der Proteine von der Säule erfolgte durch einen Stufengradient mit einer Endkonzentration von 0,8 M Essigsäure (=100 %). Jede Fraktion enthielt zwischen 1,6 und 1,9 ml. Auf die Säule wurden insgesamt 61 nmol Cytochrom P450 aufgetragen (Chromatogramm überlassen von Dr. H. Honeck, MDC, Berlin).

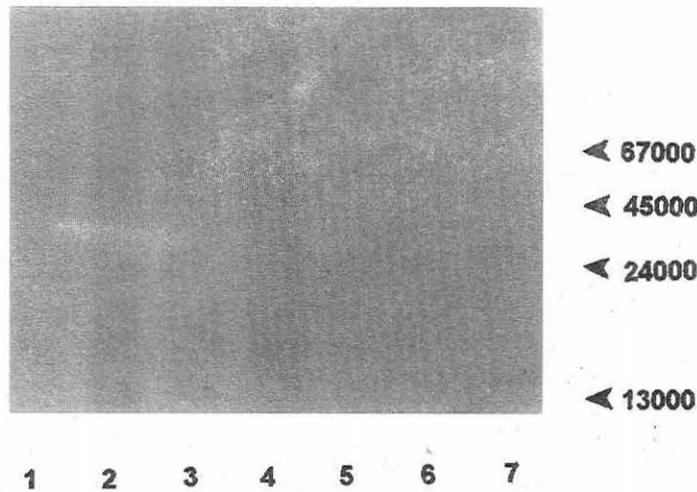


Abb. 3.4: Polyacrylamidelektrophorese von Leberhomogenat und Mikrosomenfraktion aus BNF-injizierten Regenbogenforellen sowie daraus gereinigtem CYP1A1. Spur 1-2: Homogenat, 5 und 10 µg; Spur 3-4: Mikrosomen, 2,5 und 5 µg; Spur 5-6: gereinigtes CYP1A1, 0,25 und 0,5 µg; Spur 7: Molekulargewichtsmarker. Anfärbung der Proteine mit Coomassie Blue.

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

gierten. Der Subtyp der Antikörper konnte als IgG1 bestimmt werden. Die Antikörper aus beiden Klonen waren darüber hinaus in der Lage eine einzige Proteinbande im Western Blot von Mikrosomen aus BNF-induzierten Forellen zu erkennen. In Kontrolltieren konnte keine Bande nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die beobachtete Bande war identisch mit der Bande des gereinigten CYP1A1 im Proteingel und lag zwischen den Banden der Molekulargewichtsmarker von 45 000 und 67 000 Dalton (Abb. 3.4 und 3.6). Darüber hinaus zeigt die Abb. 3.2, daß der Nachweis von CYP1A1 im Western Blot auch im Homogenat der Leber möglich war. Die optimale Verdünnung für die Zellkulturüberstände beider Hybridomklone wurde durch Inkubation von 20 µg mikrosomalem Protein, das nach Gelelektrophorese auf Nitrozellulose transferiert war, in verschiedenen Verdünnungen der Kulturüberstände beider Hybridomklone ausgetestet. Der Klon 1 zeigte bis zu einer Verdünnung von 1:32, Klon 2 bis zu einer Verdünnung von 1:16 die gleiche Bandenanfärbung (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Untersuchungen wurde, falls nicht anders angegeben, nur noch der Klon 1 verwendet.

Eine spezifische Bindung der gewonnen Antikörper an CYP1A1 konnte auch im ELISA nachgewiesen werden. Hierzu wurden Mikrotiterplatten, die mit 10 µg/ml CYP1A1 beschichtet waren, mit den Kulturüberständen der beiden CYP1A1-positiven Hybridomklone inkubiert. Als Vergleich wurde die Bindung eines kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpers gegen Kabeljau-CYP1A1 überprüft. Wie die Abb. 3.7 zeigt, bindet auch dieser Antikörper an gereinigtes CYP1A1 im ELISA. Bei dem kommerziellen erhältlichen Antikörper handelte es sich um ein gereinigtes und konzentriertes Präparat, das üblicherweise in Verdünnungen im Bereich von 1:500 verwendet wird. Für die in dieser Arbeit verwendeten Kulturüberstände der Klone 1 und 2 konnte bis zu einer 10fachen Verdünnung die gleichen Extinktionen nach ABTS-Inkubation beobachtet werden. Vergleicht man die optimalen Verdünnungen der Klone 1 und 2 mit dem Kabeljau-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:320 bis 1:640, so zeigte der Kabeljau-Antikörper eine verringerte Bindung, angezeigt durch eine vierfach verringerte Extinktion nach ABTS-Inkubation (Abb. 3.7). Wurde der Kabeljau-Antikörper bis zu einer Verdünnung von 1:10 für den Nachweis von CYP1A1 in Mikrosomen von BNF-injizierten Forellen eingesetzt, so konnte weder im Western Blot noch im ELISA eine Bindung beobachtet werden.

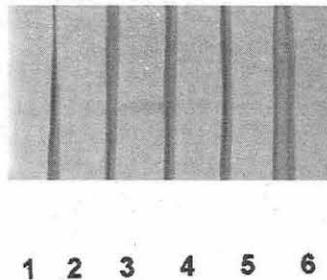


Abb. 3.5: Western Blot mit Mikrosomen aus der Leber der Regenbogenforelle. Spur 1 und 2: Kontrolltiere, 5 und 2,5 µg Protein; Spur 3 -6: BNF-injizierte Forellen, je 2,5 und 1,25 µg Protein im Wechsel. Western Blot von Spur 1-4 wurde mit einer 1:10 Verdünnung des Kulturüberstandes von Klon 1, Spur 5-6 mit einer 1:10 Verdünnung von Klon 2 durchgeführt.

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

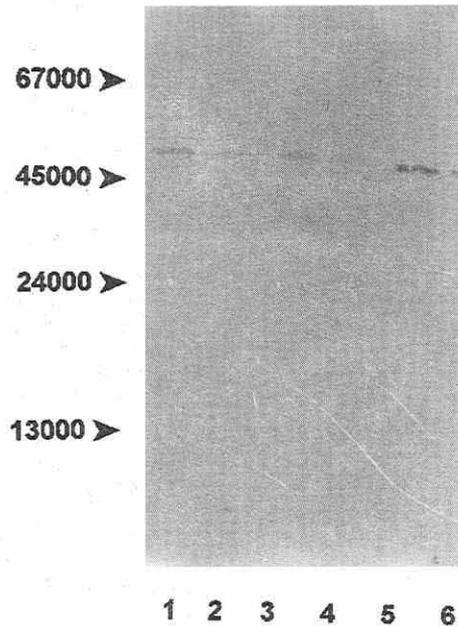


Abb. 3.6.: Western Blot von Leberhomogenat und -mikrosomen BNF-injizierter Regenbogenforellen. Spur 1-2: Homogenat, 1 und 0,5 µg Protein; Spur 3-4: Mikrosomen, 0,5 und 0,25 µg Protein; Spur 5-6: gereinigtes CYP1A1, 0,05 und 0,025 Protein. Alle Spuren wurden mit dem Kulturüberstand von Klon 1, 1:10 verdünnt, inkubiert.

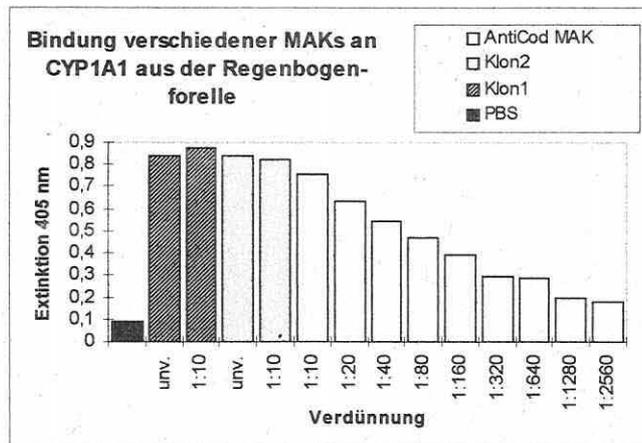


Abb. 3.7: Bindung der in dieser Arbeit hergestellten Antikörper (Klon 1 und 2) und eines monoklonalen Antikörpers (MAK) gegen Kabeljau (AntiCod MAK) an CYP1A1 aus der Regenbogenforelle. Antikörper der Klone 1 und 2 wurden direkt als Kulturüberstände oder 1:10 verdünnt verwendet. AntiCod MAK war ein gereinigtes Präparat mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml. Die ELISA-Platten wurden mit 10 µg/ml CYP1A1 beschichtet. Die Extinktion bei 405 nm wurde nach 45 min Inkubation mit ABTS gemessen (Durchgeführt von Frau Dr. I. Behn, Universität Leipzig).

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

Im Gegensatz zum Kabeljau-Antikörper - der wie bereits erwähnt nur eine Bindung an gereinigtes CYP1A1 zeigte - waren die gegen Forellen-CYP1A1 in dieser Arbeit hergestellten Antikörper auch in der Lage CYP1A1 in Mikrosomen und Homogenat von induzierten Forellen nachzuweisen. Geringe Mengen CYP1A1 konnten auch im Homogenat und in den Mikrosomen von Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 3.8, dargestellt ist nur die Bindung von Antikörpern aus dem Hybridomaklon 1. Ein Nachweis von CYP1A1 in den Mikrosomen von unbehandelten Tieren war mit dem Western Blot nicht möglich (Abb. 3.5). Als zusätzlicher Test für die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen CYP1A1 wurden sie auf ihre Inhibitionskapazität der EROD-Aktivität überprüft. Keiner der untersuchten Antikörper war in der Lage die EROD-Aktivität in Mikrosomen der Forellenleber zu inaktivieren bzw. zu verringern.

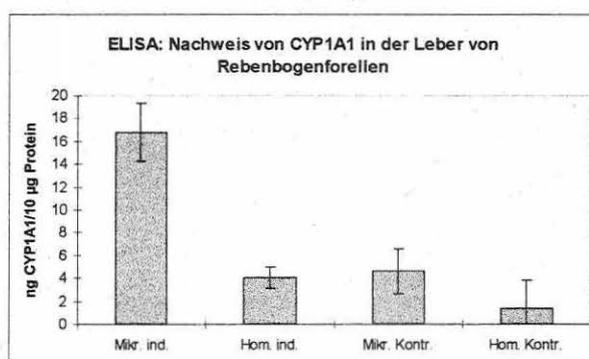


Abb. 3.8.: Nachweis von CYP1A1 in Mikrosomen und Homogenat von Forellenleber mit Antikörpern aus dem Hybridoma Klon 1. Die ELISA-Platten wurden mit 10 µg/ml Protein beschichtet. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Eichkurve mit CYP1A1. (n=3, Mittelwert ± Standardabweichung)

#### 3.3.4 Entwicklung eines ELISAs

Im vorigen Abschnitt wurde der Entwicklung eines ELISAs zur quantitativen Bestimmung von CYP1A1 zum Teil bereits vorweggegriffen, in dem die hier erzielten Ergebnisse bei den weiter oben beschriebenen Versuchen mit eingeflossen sind. Bei der ELISA-Evaluierung wurden zwei verschiedene Beschichtungsverfahren auf ihre unterschiedliche Sensitivität und der Einfluß der Proteinmenge, mit der die ELISA-Platten beschichtet wurden, auf die nachgewiesene CYP1A1-Menge untersucht.

Beide ELISA-Verfahren, direkter und kompetitiver ELISA, zeigten die gleiche Sensitivitätsgrenze. Beide ELISA-Typen konnten noch bis zu 6,25 ng CYP1A1/ml nachweisen (Abb. 3.9). In allen weiteren Versuchen wurde aber der direkte ELISA durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde wesentlich weniger gereinigtes CYP1A1 benötigt, da eine Vorbeschichtung der ELISA-Platten mit CYP1A1 entfiel.

Die Menge an mikrosomalem Protein, mit der die Platten beschichtet wurden, und die im ELISA bestimmte CYP1A1-Menge zeigten keine lineare Korrelation (Abb. 3.10). Bei höheren Konzentrationen (10 µg/ml, was der üblicherweise verwendeten Menge im ELISA entspricht (Peters & Baumgarten, 1988)) konnte ein Sättigungseffekt beobachtet werden. Aufgrund der fehlenden Linearität wurde in den folgenden Versuchen darauf geachtet, daß alle Platten immer mit genau 10 µg/ml Protein beschichtet wurden.

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

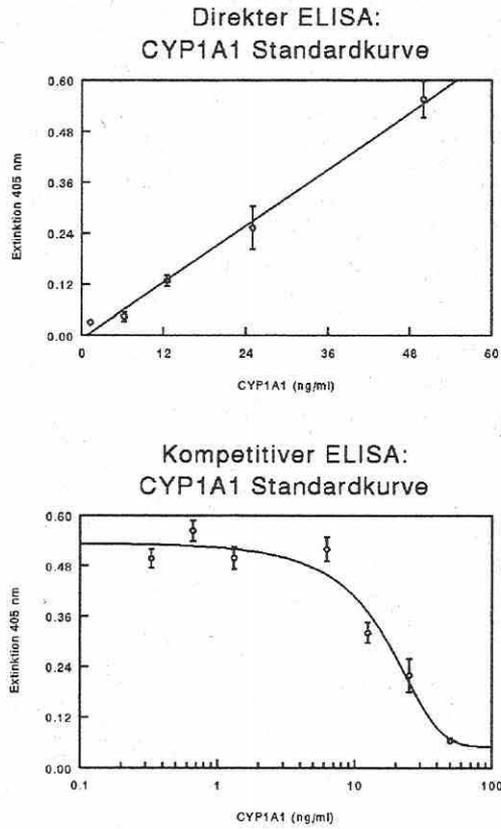


Abb. 3.9: ELISA-Eichkurven mit CYP1A1 und Antikörpern des Klon 1. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 Messungen  $\pm$  Standardabweichung.

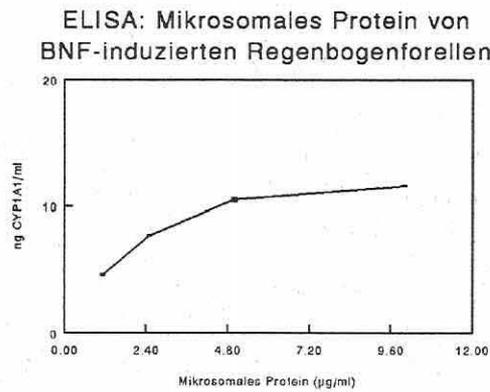


Abb. 3.10: Abhängigkeit der CYP1A1-Bestimmung von der Proteinkonzentration. ELISA-Platten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von mikrosomalem Protein aus der Leber von induzierten Regenbogenforellen beschichtet. Die CYP1A1-Menge wurde über eine Standardkurve ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Messungen (Standardabweichung < 5 %).

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

#### 3.3.5 Induktion von CYP1A1 in Primärkulturen von Regenbogenforellen-Hepatozyten

Die Exposition kultivierter Hepatozyten in 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  BNF führte zu einer signifikanten Induktion von CYP1A1. Die Induktion konnte gleichermaßen durch Messung der EROD-Aktivität und durch die Bestimmung der CYP1A1-Proteinmenge im ELISA nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Die Induktionsantwort war noch höher, wenn die Zellen für vier Tage anstatt für zwei Tage mit dem Induktor inkubiert wurden. Obwohl der immunochemische Nachweis von CYP1A1 ähnliche Ergebnisse ergab wie die katalytische Methode, so konnten doch Unterschiede zur kinetischen Meßmethode beobachtet werden. Während EROD eine dreifache (für 0,1  $\mu\text{M}$  BNF bei zwei Tagen Inkubation) bis 13fache (für 1  $\mu\text{M}$  BNF bei 4 Tagen Inkubation) Erhöhung zeigte, erreichte die im ELISA bestimmte CYP1A1-Menge weniger als das Doppelte (für 0,1  $\mu\text{M}$  BNF bei zwei Tagen Inkubation) und überstieg nicht das vierfache der Kontrolle (bei 1  $\mu\text{M}$  BNF und vier Tagen Inkubation).

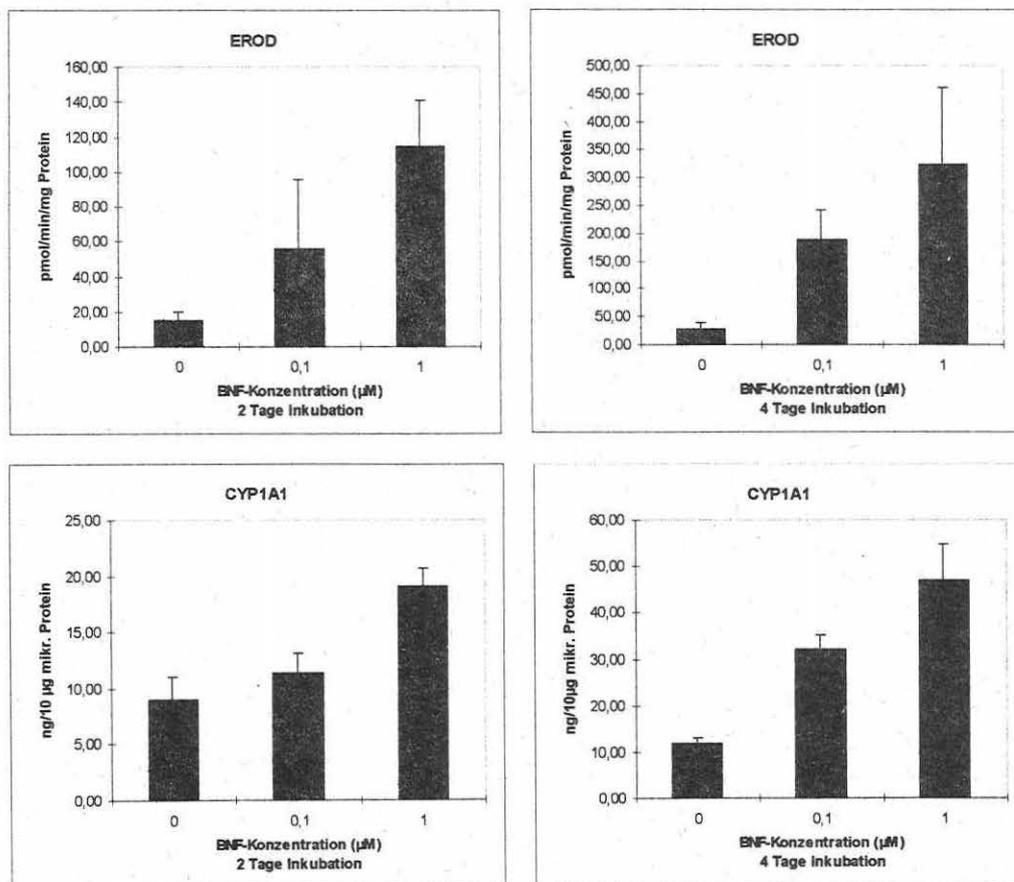


Abb. 3.11: Induktion von CYP1A1 in Primärzellkulturen von Hepatozyten der Regenbogenforelle. Die Hepatozyten wurden für zwei oder vier Tage in HMEM-Medium mit 0,1 oder 1  $\mu\text{M}$  BNF inkubiert. Die Induktion wurde enzymatisch über die EROD-Aktivität oder durch immunologische Quantifizierung des CYP1A1-Proteins im ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Experiments.

### 3.4 Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen in diesem Kapitel war es, einen monoklonalen Antikörper gegen CYP1A1 aus der Leber der Regenbogenforelle zu entwickeln. Der Antikörper sollte eingesetzt werden, um die Induktion von CYP1A1 in Primärkulturen mittels immunochemischer Methoden nachzuweisen. Obwohl verschiedenen Untersuchungen Antikörper zum Nachweis von Fisch-CYP1A1 verwenden, haben nur einige wenige Arbeitsgruppen einen polyklonalen Antikörper gegen Forellen CYP1A1 entwickelt (Myers et al., 1993; Ronis et al., 1992) und nach meinem Kenntnisstand ist bisher kein monoklonaler Antikörper gegen Forellen CYP1A1 beschrieben. Da die Regenbogenforelle aber das meist verwendete Teleosteer-Modell darstellt, ist es sehr wichtig einen monoklonalen Antikörper zur Untersuchung der CYP1A1-Induktion nutzen zu können.

#### 3.4.1 *In vivo* Beobachtungen über Biotransformationsenzyme der Forellenleber

UGT und GST zeigten eine erhöhte Aktivität in der Leber von BNF-induzierten Forellen. Der Anstieg von UGT und GST in BNF-behandelten Forellen kann damit erklärt werden, daß auch diese Enzyme - oder zumindest einzelne Isoenzyme - unter der Kontrolle des Ah-Rezeptors sind (Bock, 1993). Für alle Enzyme, insbesondere aber für die Phase 1-Enzyme zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren und Präparationen. Offensichtlich existierten große individuelle Unterschiede bezüglich der Induzierbarkeit der Biotransformationsenzyme. Die hier gemachten Beobachtungen über relativ große individuelle Unterschiede bei den Enzymaktivitäten konnten auch in Kapitel 5 dieser Arbeit bei der Erstellung von Primärzellkulturen aus der Leber verschiedener Individuen bestätigt werden.

Die Kontrolle der einzelnen Zentrifugationsschritte bestätigte die von (Statham et al., 1977) vorgenommene Lokalisierung der verschiedenen Enzyme in den einzelnen Zellkompartimenten (Abb. 3.2). EROD, ECOD, NCR und UGT sind membranständige Enzyme des endoplasmatischen Retikulums (Arinc, 1995; Burchell & Coughtrie, 1989; Koymanns et al., 1993) und die höchsten Aktivitäten wurden daher in der Mikrosomenfraktion gemessen. Die GST der Säuger ist ein zytosolisches Enzym und in der mikrosomalen Fraktion sind nur geringe Aktivitäten nachgewiesen worden (Mannervik & Danielson, 1988). Auch für die Forelle wurden hier die höchsten Aktivitäten im Zytosol festgestellt. Die hohen Aktivitäten im Homogenat sind darauf zurückzuführen, daß es das Zytosol mit beinhaltet. Beim Vergleich der EROD und ECOD-Aktivität konnten Unterschiede in der Ausprägung der Kompartimentierung in der Zelle beobachtet werden: Die ECOD-Aktivität im Homogenat und im 20 000 g Pellet war relativ hoch gegenüber der Mikrosomenfraktion. Für EROD dagegen waren die im Homogenat und im 20 000 g Pellet gemessenen Enzymaktivitäten relativ gering. Nach (Statham et al., 1977) dürfte das 20 000 g Pellet die Mitochondrien und Peroxisomen umfassen. Die Unterschiede zwischen ECOD und EROD könnten demnach in einer etwas unterschiedlichen Isoenzympezifität liegen, wobei ECOD möglicherweise verstärkt Isoenzyme nachweist, die in den Mitochondrien und/oder Peroxisomen lokalisiert sind. Diese verschiedene Isoenzympezifität könnte auch Ursache einer veränderten Induktionsantwort, wie sie mit ECOD gemessen wurde, sein und wird ausführlicher im Kapitel 5 diskutiert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, daß der katalytische Nachweis von CYP1A1 mit 7-Ethoxycoumarin zu wesentlich geringeren Aktivitäten führte als mit 7-Ethoxyresorufin. Neben der schon erwähnten Isoenzymspezifität könnte hier aber auch eine unterschiedliche Affinität der beiden Substrate an das aktive Zentrum von CYP1A1 die Ursache gewesen sein.

### 3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1

#### 3.4.2 Charakterisierung des Antikörpers und seine Verwendung in Primärzellkulturen

Verschiedene Faktoren sprachen dafür, daß der entwickelte monoklonale Antikörper spezifisch für CYP1A1 war:

1. Die Antikörper reagierten nur mit einer einzigen Proteinbande in Homogenaten und Mikrosomen der Leber von induzierten Forellen, die nach Polyacrylamidgelelektrophorese auf Nitrozellulose transferiert worden waren (Abb. 3.5 und 3.6). Die nachgewiesene Bande im Western Blot war identisch mit der Bande des gereinigten CYP1A1 im Proteingel (Abb. 3.4). Das Molekulargewicht der Bande lag zwischen 45 000 und 67 000, was mit dem Molekulargewicht von Forellen-CYP1A1 (58 000) und vieler anderer P450-Isoenzyme (45 000-60 000) übereinstimmte (Goksøyr & Förlin, 1992).

2. Ein paralleler Anstieg der Enzymaktivität EROD und der CYP1A1-Proteinmenge, immunologisch nachgewiesen mit ELISA und Western Blot, konnte nach Induktion mit BNF *in vivo* (Injektion von BNF in Regenbogenforellen) und *in vivo* (Inkubation von Hepatozyten-Primärkulturen mit BNF) beobachtet werden (Abb. 3.8 und 3.11). Da BNF als spezifischer Induktor für CYP1A1 und mit der katalytischen Aktivität EROD beschrieben wurde (Celandier & Förlin, 1991; Haasch et al., 1993b; Ioannides & Parke, 1993; Masfarau et al., 1992a; Stegeman et al., 1986) und kein CYP1A1 oder nur geringe Mengen in Kontrolltieren und -zellen nachgewiesen werden konnte, unterstützten diese Beobachtungen die Ansicht, daß der entwickelte Antikörper spezifisch für CYP1A1 war. Die Tatsache, daß keiner der Antikörper die EROD-Aktivität inhibierte, ist kein Gegenargument für die Spezifität, da es sehr wahrscheinlich ist, daß die untersuchten Antikörper nicht an Epitope des aktiven Zentrums binden konnten.

3. Durch die Antikörper wurde ein Protein erkannt, daß im Western Blot nur nach Induktion mit BNF - ein für CYP1A1 spezifischer Induktor - nachzuweisen war (Abb. 3.6). Im ELISA wurden durch den Antikörper in Kontrolltieren bzw. Kontrollzellen geringere Mengen CYP1A1 als in BNF-induzierten Tieren oder BNF-inkubierten Zellen festgestellt (Abb. 3.8 und 3.11).

Die unterschiedlichen Beobachtungen, die mit ELISA und Western Blot gemacht wurden, lassen sich unter Umständen mit einer geringeren Sensitivität im Immunoblotting-Verfahren erklären: Während sich mit Hilfe des ELISAs - wie auch durch Messung der EROD-Aktivität - auch in Kontrolltieren geringe CYP1A1-Mengen nachweisen ließen, konnte im Western Blot keine Anfärbung einer CYP1A1-Bande beobachtet werden (Tab. 3.1, Abb. 3.1, 3.5, 3.8 und 3.11).

Beim Vergleich der Antikörper der Klone 1 und 2 mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen Kabeljau-CYP1A1 wies der Kabeljau-Antikörper eine geringe Bindungskapazität an Forellen-CYP1A1 auf. Eine Bindung des Kabeljau-Antikörpers konnte nur dann nachgewiesen werden, wenn ELISA-Platten mit 10 µg/ml gereinigtem CYP1A1 beschichtet wurden. Eine mit den Antikörpern aus Klon 1 und 2 vergleichbare Bindung konnte auch nur bei geringer Verdünnung (1:10) beobachtet werden, obwohl es sich bei dem Kabeljau-Antikörper, um ein gereinigtes, konzentriertes Präparat handelte, daß üblicherweise in einer Verdünnung im Bereich von 1:500 verwendet wird (Abb. 3.7). In Western Blots oder bei Verwendung von mikrosomalem Protein, daß bis zu 1000fach geringer als gereinigtes CYP1A1-Protein konzentriert war, konnte dagegen kein CYP1A1 nachgewiesen werden. Dies spricht für eine relativ schwache Kreuzreaktivität des monoklonalen Kabeljau-Antikörpers und unterstreicht die Bedeutung, die die Entwicklung eines Spezies-spezifischen Antikörpers für Forellen-CYP1A1 hat.

Im weiteren wurde die Eignung der Antikörper für eine Verwendung in einem quantitativen ELISA überprüft. Wegen der prinzipiell gleichen Sensitivität des direkten und kompetitiven ELISAs (Abb. 3.9) wurde bei allen nachfolgenden Untersuchungen nur der direkte ELISA

verwendet, da aufgrund fehlender Vorbeschichtung wesentlich weniger gereinigtes CYP1A1 benötigt wird.

Goksøyr (1991), der den monoklonalen Antikörper gegen Kabeljau-CYP1A1 entwickelte, berichtete eine nicht lineare Beziehung im ELISA zwischen der Proteinmenge, mit der die Platten beschichtet wurden, und der nachfolgend bestimmten CYP1A1-Menge. Für den monoklonalen Forellen-CYP1A1-Antikörper konnte ein ähnlicher Sättigungseffekt festgestellt werden (Abb. 3.10.). Daher war es nötig, die Platten immer genau mit der gleichen Menge Protein zu beschichten (10 µg/ml). Die Standardkurve im direkten ELISA zeigte dagegen bei Verwendung einer CYP1A1-Menge bis 50 ng/ml eine lineare Abhängigkeit zwischen Proteinmenge und der Extinktion bei 405 nm nach ABTS-Inkubation (Abb. 3.9). Der Sättigungseffekt konnte also nur beobachtet werden, wenn mikrosomales Protein an Stelle von gereinigtem CYP1A1 verwendet wurde. Goksøyr bezeichnete daher seinen ELISA-Test als semi-quantitativ, da die erzielbaren Ergebnisse eher relative als absolute Werte darstellten.

Verschiedene Autoren haben bisher gezeigt, daß Primärkulturen von Fischhepatozyten für den Nachweis einer Induktion von CYP1A1 durch BNF und andere polyaromatische Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden können (Masfaraud et al., 1992a; Pesonen & Andersson, 1991; Vaillant et al., 1989). Sie erhielten ein Maximum der EROD-Aktivität nach zwei Tagen Exposition, wenn eine einmalige Dosis von BNF verabreicht wurde. Nach dem Austausch des Mediums gegen ein Induktor-freies Medium fiel die EROD-Aktivität innerhalb von 1-2 Tagen wieder ab. In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Anstieg der EROD-Aktivität von einer parallelen Zunahme der immunologisch im ELISA bestimmten CYP1A1-Menge begleitet war (Abb. 3.11). Auch wenn die im ELISA gemessene Zunahme der CYP1A1-Menge geringer war als die Zunahme der EROD-Aktivität, so könnte der immunologische Nachweis in Zellkulturen dennoch Vorteile haben: 1. Für die Messung ist nur eine geringe Menge Protein notwendig (weniger als 10 µg mikrosomales Protein). 2. Der Nachweis der CYP1A1-Induktion ist auch dann möglich, wenn die Induktoren - wie z.B. bestimmte PCB-Kongenere - gleichzeitig die enzymatische Aktivität von CYP1A1 inhibieren (Goksøyr et al., 1991b).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Induktionsantwort weiter gesteigert werden konnte, wenn die Applikation des Induktors über einen verlängerten Zeitraum fortgesetzt wurde (Abb. 3.11). Dies könnte von Vorteil sein, wenn mit dem Testsystem geringe Konzentrationen von Induktoren z.B. in Gewässerproben nachgewiesen werden sollen, da die Sensitivität auf diese Weise gesteigert werden könnte.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte trotz intensiver Literaturstudien nur eine Forschungsarbeit aufgefunden werden, die die Verwendung von Antikörpern in Primärkulturen von Fischleberzellen demonstriert. Miller et al. (1993a, b) berichteten den Erhalt und die Induktion von CYP1A1 bei Exposition der Zellen in Acetaminophen. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen war dies nur möglich, wenn die Leberzellen aus Forellen isoliert wurden, die zuvor mit BNF behandelt wurden. Dieser Unterschied könnte eine Folge unterschiedlicher Basiskonzentrationen von CYP1A1 in den für die Zellisolation verwendeten Tieren sein.

Die Ergebnisse dieses Kapitels und aus dem Kapitel 5 zeigen, daß der Nachweis der CYP1A1 Induktion in Leberzellkulturen der Regenbogenforelle sowohl mit immunologischen als auch mit enzymatischen Methoden ein geeignetes Mittel zur Erstellung von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen und zum Nachweis einer PAH-Belastung in Umweltproben sein könnte. Im Vergleich zu Tierexperimenten können Zellkulturuntersuchungen mit wesentlich geringerem Aufwand durchgeführt werden. Darüber hinaus erlauben sie eine bessere Kontrolle der experimentellen Bedingungen und führen zu einer drastischen Reduzierung der Anzahl der benötigten Versuchstiere.

### *3. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers zum Nachweis von CYP1A1*

#### **Anmerkung**

Die Untersuchungen in diesem Kapitel wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Honeck, MDC, Berlin und Frau Dr. I. Behn, Universität Leipzig durchgeführt. Herr Dr. H. Honeck führte die Reinigung von CYP1A1 aus den Mikrosomen der Forellenleber durch. Frau Dr. I. Behn präparierte den monoklonalen Antikörper. Die Präparation der Mikrosomenfraktion und aller damit verbundenen Untersuchungen wurden von mir selbst als Gast an der Universität Heidelberg bei Herrn Dr. T. Braunbeck mit Unterstützung von Herrn Dipl. Biol. C. Hauck durchgeführt. Alle begleitenden Untersuchungen zur Spezifität der monoklonalen Antikörper (Ausnahme Abb. 3.7) sowie die Primärzellkulturen der Hepatozyten wurden von mir durchgeführt. Sofern bei den tabellarischen und graphischen Darstellungen nicht von mir durchgeführte Untersuchungen zu Grunde lagen, ist dies im Begleittext vermerkt (i.e. Tab. 3.1 und Abb. 3.3 und 3.7).

## 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Hepatozyten der Regenbogenforelle in Primärkultur: Einfluß der Kulturbedingungen

### 4.1 Zusammenfassung

Es wurden die Effekte verschiedener Kulturbedingungen und der Einfluß von Zell-Zell-Interaktionen auf die Vitalität, die Zellanheftung und die Aktivitäten von Biotransformationsenzymen in Primärzellkulturen von Hepatozyten aus der Regenbogenforelle untersucht. Ein rascher Abfall des Cytochrom P450-Gehaltes und ein Absinken der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase-Aktivität während der ersten Tage der Primärkultur konnte beobachtet werden. Im Unterschied dazu konnte ein Anstieg der Aktivität des Fremdstoff-metabolisierenden Cytochrom P450-Isoenzym CYP1A1 - gemessen über dessen Enzymaktivität EROD (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase) - gezeigt werden. EROD war in frisch isolierten Zellen nicht oder nur mit sehr geringer Aktivität nachweisbar, während nach längerer Kulturdauer über 100 pmol/min/mg Protein gemessen werden konnten. Die Aussaat von Hepatozyten auf Collagen-beschichteten Kulturschalen oder die Supplementierung des Mediums mit verschiedenen Hormonen und Kofaktoren hatte einen geringen Effekt auf die Vitalität und die Ausbildung spezifischer Funktionen. Die ausgeprägtesten Effekte bewirkte die Kokultur von Leberzellen mit drei verschiedenen Zelllinien aus der Regenbogenforelle, der R1-, der RTG-2- und der RTH-149-Zelle. Insbesondere die RTG-Zelllinie war in der Lage die Ablösung der Leberzellen von den Kulturschalen zu reduzieren. Zudem steigerten sie in drei Tage alten Primärkulturen die EROD-Aktivität um mehr als das dreifache. Auf der Basis dieser Befunde wurde die Kokultur mit RTG-Zellen als Standardmethode für alle weiteren Experimente eingeführt.

### 4.2 Einleitung

Die Primärkultur von Säugerhepatozyten ist eine weit verbreitete, anerkannte Methode zur Untersuchung des hepatischen Metabolismus und zur Studie toxischer Mechanismen sowie der Biotransformation von Fremdstoffen (Blaauboer et al., 1994; Chenery, 1987; Rogiers & Vercruyse, 1993; Scheepers et al., 1991). Der größte Nachteil konventionell isolierter und kultivierter Primärhepatozyten ist der rasche Abfall von wichtigen zellulären Funktionen bei der *in vitro*-Inkubation (Holme et al., 1983; Paine et al., 1982; Skett, 1994; van't Klooster et al., 1992). Insbesondere die Aktivitäten von Biotransformationsenzymen werden während der Kultur substantiell verringert. Mit dem Ziel, Zellvitalität und -funktionalität in der Primärkultur zu erhalten, wurden bisher im wesentlichen zwei Ansätze untersucht: Die selektive Supplementierung der Zellkulturmedien mit verschiedenen Faktoren wie Hormonen (Castell et al., 1983; Lindsay et al., 1991; Vind et al., 1992) oder der Versuch, Elemente einer natürlichen Mikroumgebung - wie im intakten Organ - in der Zellkultur zu etablieren.

*In vivo* ist die Säugerleber ein komplexes Organ verschiedener Zelltypen mit entsprechender funktioneller Spezialisierung (Guguen-Guillouzo, 1986; Guguen-Guillouzo & Corlu, 1993). Im Gegensatz dazu sind die Hepatozyten in der Primärkultur von ihrer normalen, durch Heterogenität, Dreidimensionalität und der Regulation durch verschiedene hormonelle Signale charakterisierten Umgebung isoliert. Verschiedene Ansätze sind gemacht worden, um *in vivo*-ähnliche Charakteristika durch entsprechende Annäherung der Kulturbedingungen an die *in vivo*-Situation zu erreichen. Neben dem Wachstum auf verschiede-

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

nen extrazellulären Matrices (Bissel et al., 1987; Guguen-Guillouzo et al., 1982; Sawada et al., 1987; van't Klooster et al., 1992) wurde die Kultur auf Mikrocarriern, permeablen Membranen oder in dreidimensionalen Aggregations-Suspensionskulturen angewandt (Guery et al., 1993; Li et al., 1993; Voss & Seibert, 1991, 1992). Die besten Resultate aber wurden erzielt, wenn Hepatozyten zusammen mit einem zweiten Zelltyp kultiviert wurden (Begue et al., 1984; Clément et al., 1984; Donato et al., 1991; Guguen-Guillouzo & Corlu, 1993; Guguen-Guillouzo & Goullouzo, 1983; Guguen-Guillouzo et al., 1983; Kuri-Harcuch & Mendoza-Figueroa, 1989; Niemann et al., 1991; Rogiers & Vercruysse, 1993). Diese Kokulturrexperimente waren von der Idee inspiriert, daß adulte Hepatozyten die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen benötigen, um ihre spezifischen Funktionen zu erhalten. Zusätzliche Hinweise für die Beteiligung von solchen spezifischen Zell-Zell-Interaktionen wurden von der Beobachtung geliefert, daß verschiedene Zelltypen auch in unterschiedlichem Maße die Expression von Biotransformationsenzymen beeinflussen: So waren Zelllinien, die von nicht epithelialen Leberzellen (NEC, Liver Non Epithelial Cells) abstammten, wesentlich effektiver in der Unterstützung verschiedener hepatischer Funktionen als fibrozytische Zelllinien (Donato et al., 1990; Utesch & Oesch, 1992; Utesch et al., 1991).

Techniken für die Primärkultur von Teleosteerhepatozyten sind erst im letzten Jahrzehnt entwickelt worden (Blair et al., 1990; Hanninen et al., 1991; Klaunig, 1986; Mommsen et al., 1994; Moon et al., 1985; Parker et al., 1981; Zahn & Braunbeck, 1993). In der Mehrzahl dieser Systeme wurden Monolayer-Kulturen und chemisch definierte, Serum-freie Medien eingesetzt, auch wenn einzelne Versuche unternommen wurden, den Einfluß auf die Vitalität und Anheftung der Hepatozyten durch verschiedene Substrate, Aggregate und Medienzusätze zu untersuchen (Flouriot et al., 1993; Kocal et al., 1988; Lipsky et al., 1986). Nur sehr wenige Studien stellen dagegen Datenmaterial über die Aktivitäten und Veränderungen von Biotransformationsenzymen in der Primärkultur von Fischhepatozyten zur Verfügung: Miller et al. (1993a, 1989) berichteten einen raschen Abfall von EROD (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase) während der ersten 24 Stunden in der Kultur, unabhängig davon, ob die Hepatozyten aus normalen oder  $\beta$ -Naphtoflavon-induzierten Forellen stammten. (Pesonen & Andersson, 1991; Vaillant et al., 1989) zeigten dagegen, daß die EROD-Aktivität während der ersten zwei bis drei Kulturstage anstieg, bis sie dann leicht abfiel oder bis zu einer Kulturperiode von 5 Tagen stabil blieb. Prinzipiell ähnliche Ergebnisse erzielten Masfaraud et al. (1992a), obwohl das Absinken von CYP1A1 - nachgewiesen mit ECOD (7-Ethoxycoumarin-O-deethylase) - nach 3 Kulturtagen etwas stärker ausfiel als bei den zuvor genannten Autoren, die EROD für den CYP1A1-Nachweis einsetzten.

In diesem Kapitel werden Untersuchungen zur Zellvitalität, Ausprägung spezifischer Funktionen und zur Biotransformationskapazität und ihre Erhaltung in Leberzellen der Regenbogenforelle unter verschiedenen Kulturbedingungen dargestellt. Ein besonderer Schwerpunkt wird auf die Behandlung des Einflusses von Kokulturen von Hepatozyten mit verschiedenen Zelllinien gelegt.

#### 4.3 Ergebnisse

Die folgenden Indikatoren für Vitalität und spezifische Funktion der Leberzellen wurden gemessen, um den Einfluß der Kulturbedingungen auf die Primärkultur von Hepatozyten der Regenbogenforelle abzuschätzen:

1. DNA- und Proteingehalt als Indikatoren der Zellanheftung: Da der DNA- und Proteingehalt der Homogenate der Leberzellkulturen mit der Anzahl der Zellen korreliert ist, sind

diese ein direkter Nachweis für die Anheftung bzw. die Ablösung der Zellen. Sich ablösende Zellen führen zu einem reduzierten DNA- und Proteingehalt des aus dem Zell-Monolayers hergestellten Homogenats.

2. Ein Indikator, um die Vitalität der Zellen zu beurteilen ist die Abgabe von LDH (Lactatdehydrogenase) in das Kulturmedium. Zellkulturüberstände von geschädigten Zellen sind durch eine erhöhte LDH-Aktivität charakterisiert.

3. PEP-CK (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase), ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, repräsentiert ein für die Leber charakteristisches Stoffwechsellenzym und ist zudem ein Vitalitätsmarker der Hepatozyten.

4. NCR (NADPH-Cytochrom c(P450)-Reduktase) vermittelt den Elektronentransport auf die Cytochrom P450 Monooxygenase während der Phase 1 der Biotransformation.

5. GST ist ein Phase 2-Biotransformationsenzym, welches für die Konjugation von Xenobiotica an Glutathion verantwortlich ist.

6. Wie NCR und GST dienen die Messung des Gesamt-Cytochrom P450-Gehaltes und der katalytische Nachweis von CYP1A1 mit EROD als Indikatoren einer der wichtigsten Leberfunktionen, der Biotransformation der Phase 1.

#### 4.3.1 Einfluß der Zellaggregation auf die Ausbildung spezifischer Funktionen der Leberzellen

Während der zahlreichen Zellisolationen und anschließenden Inkubationen konnten bereits nach 24 h Kulturdauer erste Aggregationen (Verschmelzen bzw. Zusammenwachsen einzelner Zellen zu Gewebe-artigen Verbänden) der Hepatozyten beobachtet werden (Abb. 4.1, rechtes Bild), die mit verlängerter Kulturdauer immer weiter fortschritten, so daß im Lichtmikroskop nur noch schwer einzelne Zellen zu erkennen waren (Abb. 4.6, unteres Bild). Bei einigen Isolationen dagegen konnte eine solche Aggregation nicht beobachtet werden (Abb. 4.1, linkes Bild). Diese Isolationen wurden in der Regel nicht für die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Kulturbedingungen herangezogen. Bei genauerer biochemischer Charakterisierung dieser nicht aggregierten Zellen im Vergleich zu normalen Primärkulturen zeigten sie die fehlende Ausprägung ganz spezifischer Funktionen. Während der Cytochrom P450-Gehalt und die Aktivitäten der Enzyme NCR und PEP-CK sowohl bei den nicht aggregierten als auch bei den aggregierten Zellen in der gleichen Größenordnung nachweisbar waren, konnte das Phase-2-Enzyme EROD überhaupt nur in aggregierten Zellen nachgewiesen werden und dies sowohl nach 2 als auch nach 5 Tagen Kulturdauer (Abb. 4.2).

#### 4.3.2 Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen

Die Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen hatte einen geringen Einfluß auf die Ablösung von Hepatozyten, wie anhand der höheren DNA-Gehalte pro Kulturgefaß ersichtlich wurde. Allerdings konnte keine statistische Signifikanz bis zu einer Wahrscheinlichkeitsgrenze von 80 % (t-Test,  $\alpha=20\%$ ) erzielt werden (Tab. 1). Der beobachtete Unterschied war nicht das Ergebnis einer anfänglichen Unterschiedes in der Anheftung der Hepatozyten, da die Werte für den DNA-Gehalt am Tag 2 bei  $92,9 \pm 0,46\%$  für Kontrollzellen und  $93,9 \pm 8,05\%$  für Hepatozyten auf Collagen-beschichteten Kulturgefäßen lag. D.h., daß Collagen die Ablösung der Zellen nach einer Kulturdauer von 8 Tagen reduzieren könnte.

Die Beobachtung des DNA-Verlusts während einer verlängerten Kulturperiode wurden durch das gleichzeitig meßbare Absinken der Proteinkonzentration des Homogenats bestätigt. Im Gegensatz zur DNA-Messung war beim Proteingehalt kein Unterschied zwischen Kontroll- und Collagen-beschichteten Gefäßen zu verzeichnen.

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

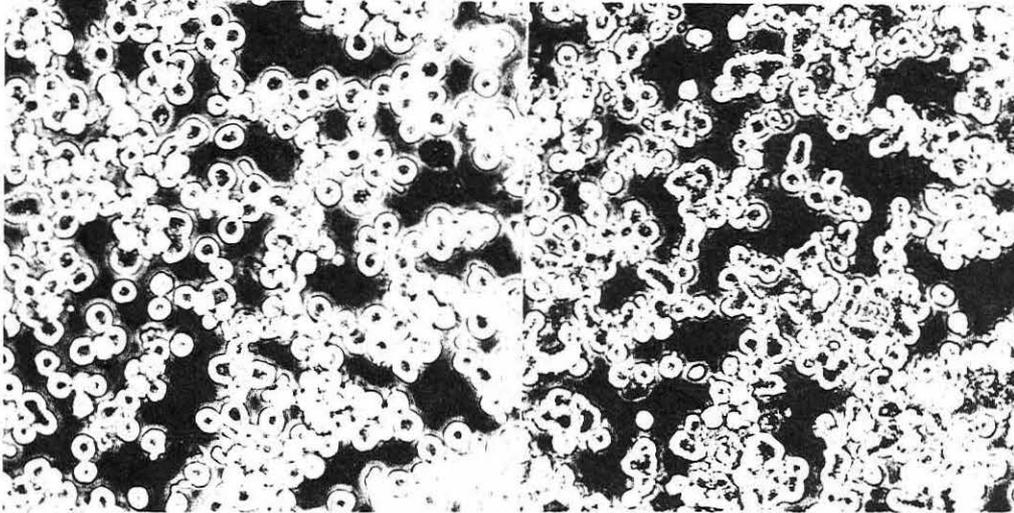


Abb. 4.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 320 x) von 24 h kultivierten Hepatozyten aus der Regenbogenforellen. Die linke Abbildung zeigt Zellen, die während der gesamten Kulturdauer nicht aggregierten, während auf dem rechten Bild erste Aggregationen zu erkennen sind.

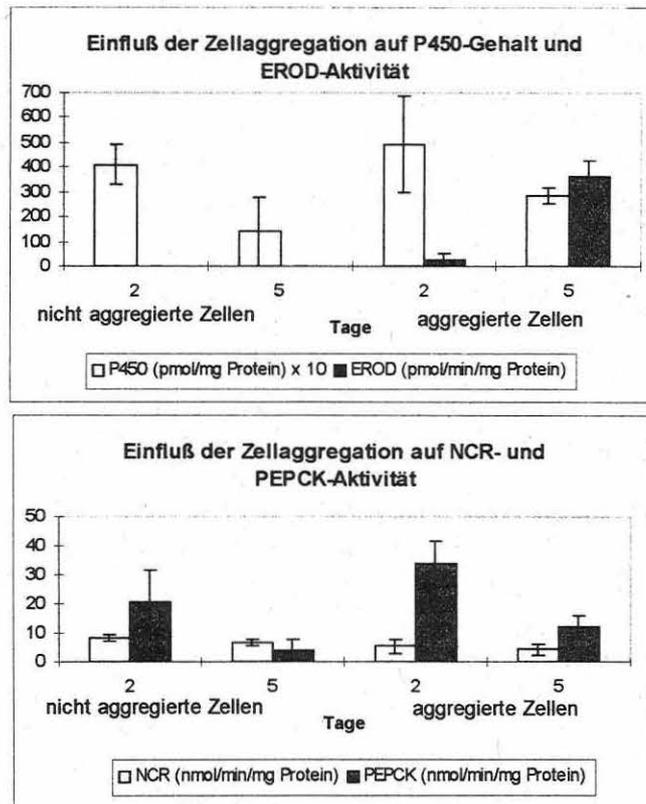


Abb. 4.2: Einfluß der Aggregation der Hepatozyten auf die Ausbildung spezifischer Funktionen in 2 und 5 Tage kultivierten Zellen (Mittelwerte aus 2 Isolation  $\pm$  Standardfehler).

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Zellablösung zeigte die Messung der LDH-Aktivität im Kulturmedium eine erhöhte Vitalität für Kulturen auf Collagen-beschichteten Kulturschalen noch nach 8 Tagen Kulturdauer an (Signifikanzniveau 80 %, Tab. 1). Auch die PEP-CK unterschied sich in gleicher Weise zwischen der Kontroll- und der modifizierten Kultur. Mit 77,0 % der Aktivität frisch isolierter Zellen nach 8 Kulturtagen war die PEP-CK Aktivität auch noch auf dem 95 % Niveau signifikant höher in den Zellen auf einer Collagenmatrix als in den Kontrollzellen, die nur 49,2 % der Aktivität frisch isolierter Zellen erreichten. Und schließlich wurde dieser zu beobachtende positive Einfluß der Collagen-Matrix auch durch Messung der Aktivitäten der Biotransformationsenzyme bestätigt: Im Vergleich zu Kontrollzellen waren sowohl das Phase 1-Enzym EROD - welches das Isoenzym CYP1A1 nachweist - als auch das Phase 2-Enzyme GST von auf Collagen-Matrix kultivierten Zellen erhöht (Tab. 4.1).

Tag	Kontrolle	Collagen
<b>DNA: 100 %=228 µg/ml</b>		
0	100.00 ± 0.00	
8	38.72 ± 4.15	50.19 ± 6.69
<b>Protein: 100 %=4.3 mg/ml</b>		
0	100.00 ± 0.00	
8	25.87 ± 3.07	24.31 ± 3.96
<b>LDH (Zellkulturmedium): 100 %=87.0 µM/min</b>		
1	100.00 ± 0.00	101.95 ± 4.80
* 8	101.28 ± 12.22	75.7 ± 2.30
<b>PEP-CK: 100 %=25.4 nmol/min/mg Protein</b>		
0	100.00 ± 0.00	
*** 8	49.23 ± 5.40	77.02 ± 6.06
<b>EROD: 100 %= 150 pmol/min/mg Protein</b>		
0	0.82 ± 0.83	
* 8	100.00 ± 0.00	274.4 ± 149.00
<b>GST: 100 % = 390 nmol/min/mg Protein</b>		
0	100.00 ± 0.00	
** 8	65.22 ± 8.34	101.1 ± 16.55

Tabelle 4.1: Einfluß der Collagenbeschichtung von Kulturgefäßen auf die Vitalität der Leberzellen und die Aktivität von spezifischen Leber- und Biotransformationsenzymen. Alle Werte wurden als Prozent der frisch isolierten Hepatozyten bzw. der Kontrolle vom Tag 1 angegeben (Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellisolationen ± Standardfehler).

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

#### 4.3.3 Supplementierung des Kulturmediums

Das Basismedium, welches für die Kultur der Forellenhepatozyten verwendet wurde, war ein Serum-freies, chemisch definiertes Medium (HMEM=Hank's buffered minimum essential medium), das aus Aminosäuren, HEPES-Puffer, Salzen, Glucose und verschiedenen Kofaktoren bestand. Basierend auf bereits publizierten Experimenten mit Rattenhepato-

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

zyten, wurde der Einfluß einer Mischung aus folgenden Zusätzen untersucht: 100 µM α-Aminolevulinsäure, 10 nM Insulin, 5 µg/ml Transferrin und 10 nM Cortisol. Die Supplementierung des Kulturmedium blieb ohne Effekt auf die Anheftung bzw. Ablösung der Zellen, wie der Verlauf von DNA- und Proteingehalt zeigte (Tab. 4.2). Die reduzierte LDH-Abgabe (Signifikanzniveau 80 %) nach 2 und 8 Tagen Kulturdauer deutete dagegen eine erhöhte Vitalität der Zellen im supplementierten Medium an. Anders als bei Hepatozyten, die auf Collagen-beschichteten Kulturgefäßen herangezogen wurden, war die PEP-CK-Aktivität unter den modifizierten Kulturbedingungen nicht erhöht. Für die EROD konnte sogar ein verringerter Anstieg der Aktivität von frisch isolierten zu 8 Tage alten Zellen beobachtet werden, wenn die Zellen im supplementierten Medium inkubiert wurden. Allerdings basieren diese Messungen nur auf einer Zellisolation, weshalb in der Tabelle auch keine Standardfehler angegeben wurden. Die GST zeigte ähnlich wie im Collagenexperiment eine geringe Aktivitätserhöhung nach 8 Tagen Inkubation unter modifizierten Kulturbedingungen.

Tag	Kontrolle	Suppl. Medium
<b>DNA: 100 %=204 µg/ml</b>		
0	100.00 ± 0.00	
8	43.20 ± 2.69	50.31 ± 8.96
<b>Protein: 100 %=4.9 mg/ml</b>		
0	100.00 ± 0.00	
8	19.26 ± 10.30	27.93 ± 4.16
<b>LDH (Zellkulturmedium): 100 %=32.0 µM/min</b>		
* 2	100.00 ± 0.00	65.39 ± 21.34
* 8	240.88 ± 20.94	157.84 ± 24.58
<b>PEP-CK: 100 %=17.7 nmol/min/mg Protein</b>		
0	100.00 ± 0.00	
8	123.57 ± 90.46	114.83 ± 76.92
<b>EROD: 100 %= 607 pmol/min/mg Protein</b>		
0	16.46	
8	100.00	25.15
<b>GST: 100 % = 390 nmol/min/mg Protein</b>		
0	100.00 ± 0.00	
* 8	132.32 ± 6.47	152.69 ± 7.82

Tabelle 4.2: Einfluß eines supplementierten Mediums auf die Vitalität der Leberzellen und die Aktivität von spezifischen Leber- und Biotransformationsenzymen. Das supplementierte Medium enthielt zusätzlich 100 µM α-Aminolevulinsäure, 10 nM Insulin, 10 nM Cortisol und 5 µg/ml Transferrin. Alle Werte wurden als Prozent der frisch isolierten Hepatozyten bzw. der Kontrolle vom Tag 1 angegeben (Mittelwerte aus 2 unabhängigen Zellisolationen ± Standardfehler; Ausnahme EROD, nur in einer Zellisolation gemessen).

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

#### 4.3.4 Kokulturen mit verschiedenen Zelllinien

Da im Collagen-Beschichtungs-Experiment und bei der Verwendung eines supplementierten Kulturmediums die einzigen signifikanten Unterschiede erst nach einer Kulturperiode von 8 Tagen (ausgenommen LDH bei Mediumsupplementierung) beobachtet werden konnten, wurden die Daten des 2. und 5. Kulturtages nicht in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt. Im Gegensatz hierzu waren in den Kokulturexperimenten auch schon nach kürzerer Kulturdauer signifikante Unterschiede zu erkennen, so daß eine detailliertere Darstellung gewählt wurde (Abb. 4.3- 4.6).

Wie in den vorausgegangenen Experimenten wurde die Aktivität als spezifische Aktivität/mg Protein ausgedrückt und auf den Prozentsatz der Aktivität in frisch isolierten Hepatozyten umgerechnet. Zusätzlich sollen hier noch die Gesamtaktivitäten pro Kulturgefäß gezeigt werden (Tab. 4.3; angegeben als Aktivität/ml Homogenat. Man beachte, daß das Volumen des Homogenats, welches individuell von verschiedenen Kulturgefäßen hergestellt wurde, während der gesamten Experimente immer gleich blieb.). Hierdurch sollte abgeschätzt werden, wie groß der Anteil der Zelllinien an der Gesamtproteinmenge und den verschiedenen Enzymaktivitäten im Vergleich zu den Hepatozyten war. Sowohl die Gesamtaktivität verschiedener Enzyme pro Kulturgefäß als auch der Gesamtgehalt von DNA und Protein waren in den Zelllinien, die ohne Hepatozyten kultiviert wurden, vergleichsweise gering (10 - 20 % der Hepatozytenwerte oder nicht nachweisbar) und/oder blieben während der gesamten Kulturdauer relativ stabil. Dies bedeutete, daß Aktivitäten und Gehalte sowie deren Änderungen, die in nicht kokultivierten Zelllinien auftraten, nicht für Änderungen der Kokultur gegenüber einer reinen Hepatozytenkultur verantwortlich sein konnten. Diese Veränderungen mußten vielmehr die Folge einer geänderten Physiologie der Hepatozyten und/oder von Zell-Zell-Interaktionen zwischen Hepatozyten und permanenten Zelllinien sein. Aus diesem Grunde wurden die Daten der Zelllinien für eine bessere Übersichtlichkeit in den Graphiken nicht dargestellt.

**Kokultur mit R1-Zellen:** Signifikante Änderungen traten bei DNA-Gehalt, LDH-Aktivität im Medium und EROD-Aktivität auf. Der erhöhte DNA-Gehalt nach 6 und 8 Tagen zeigte eine reduzierte Ablösung der Zellen vom Substrat. Auch wenn diese Daten durch die Proteinmessung bestätigt wurden, so konnte für letztere jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den DNA-Untersuchungen stand die LDH-Aktivität des Zellkulturmediums, die eine erhöhte Vitalität der Zellen nach 8 Tagen in Kultur nachwies (Abb. 4.3).

Für die Biotransformationsenzyme und die PEP-CK konnten keine statistisch signifikanten Differenzen gemessen werden, außer, daß die EROD Aktivität in den R1-Kokulturen am 4. und 8. Tag der Kultur verringert war. Bezüglich der zeitlichen Aktivitätsänderungen der Enzyme konnte beobachtet werden, daß, während NCR und GST mehr oder weniger stabil blieben, PEP-CK sehr schnell auf ca. 30 % der Aktivität in frisch isolierten Hepatozyten fiel und EROD von z.T. nicht nachweisbaren Aktivitäten auf 685 pmol/min/mg Protein am 8. Kulturtag anstieg (Abb. 4.4).

**Kokultur mit RTH-149- und RTG-2-Zellen:** Die Ablösung der Hepatozyten in den Kokulturen war bei der Verwendung von beiden Zelllinien reduziert, wie dies auch für die R1-Kokulturen beobachtet wurde. Dies zeigte den höheren Protein- und DNA-Gehalt am 6. Tag der Zellkultur (Abb. 4.5). Für diese Experimente wurden nur 2 Zellisolationen durchgeführt. Hierin liegt möglicherweise die Ursache für die relativ schwache statistische Signifikanz der Meßergebnisse, die darüber hinaus nur für die RTG-Kokulturen nach 6 Tagen Kulturdauer erreicht wurde. Die Zellablösung wurde in größerem Ausmaß durch die RTG- als durch die RTH-Zellen reduziert. Um möglichst viele Parameter gleichzeitig messen zu können, mußte die

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

Anzahl der Probennahmetage reduziert werden, da - im Gegensatz zum R1-Versuch - die aus jeder Isolation erhaltenen Hepatozyten für die Kokultur mit 2 verschiedenen Zelllinien (RTG und RTH) verwendet wurden.

Experiment 1: Hepatozyten und R1-Zellen			
	Hepatozyten	R1-Zellen	
<b>2 Tage alte Zellen</b>			
Protein (mg/ml)	2.24 ± 0.19	0.41 ± 0.06	
PEP-CK (nmol/ml/min)	56.22 ± 5.16	6.59 ± 1.29	
NCR (nmol/ml/min)	10.41 ± 1.13	3.94 ± 0.55	
LDH (µmol/ml/min) (Medium)	86.23 ± 8.81	4.70 ± 1.21	
GST (nmol/ml/min)	123.78 ± 9.44	6.84 ± 2.16	
EROD (pmol/mg/min)	58.18 ± 19.06	nicht meßbar	
DNA (µg/ml)	223.33 ± 29.35	42.83 ± 15.26	
<b>8 Tage alte Zellen</b>			
Protein (mg/ml)	1.55 ± 0.15	0.52 ± 0.09	
PEP-CK (nmol/ml/min)	4.68 ± 1.95	5.04 ± 1.51	
NCR (nmol/ml/min)	5.58 ± 1.18	4.50 ± 0.80	
LDH (µmol/ml/min) (Zellkulturmedium)	129.80 ± 56.66	0.35 ± 0.16	
GST (nmol/ml/min)	60.43 ± 16.73	6.96 ± 1.49	
EROD (pmol/mg/min)	1116.22 ± 436.07	nicht meßbar	
DNA (µg/ml)	85.50 ± 12.70	14.33 ± 3.21	
Experiment 2: Hepatozyten und RTG/RTH-Zellen			
	Hepatozyten	RTH-149-Zellen	RTG-2-Zellen
<b>3 Tage alte Zellen</b>			
Protein (mg/ml)	3.05 ± 0.02	0.56 ± 0.13	0.62 ± 0.06
P450 (pmol/ml)	135.00 ± 3.19	nicht meßbar	nicht meßbar
PEP-CK (nmol/ml/min)	66.00 ± 7.79	0.96 ± 0.68	nicht meßbar
NCR (nmol/ml/min)	28.70 ± 6.48	7.07 ± 0.27	9.03 ± 1.85
GST (nmol/ml/min)	1331.00 ± 69.70	275.22 ± 100.00	140.81 ± 33.70
EROD (pmol/mg/min)	109.00 ± 20.90	nicht meßbar	nicht meßbar
DNA (µg/ml)	328.50 ± 31.30	68.00 ± 19.80	107.00 ± 32.70
<b>6 Tage alte Zellen</b>			
Protein mg/ml	2.55 ± 0.20	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01
P450 pmol/ml	154.00 ± 40.40	nicht meßbar	nicht meßbar
PEP-CK nmol/ml/min	21.65 ± 4.38	nicht meßbar	nicht meßbar
NCR nmol/ml/min	28.70 ± 6.48	7.20 ± 0.28	7.60 ± 0.00
GST nmol/ml/min	930.00 ± 56.00	146.67 ± 45.97	207.00 ± 21.86
EROD pmol/mg/min	nicht meßbar	nicht meßbar	nicht meßbar
DNA µg/ml	160.00 ± 32.22	58.00 ± 20.53	53.00 ± 21.24

Tab. 4.3: Vergleich von Protein-, DNA-, Cytochrom P450-Gehalt und Enzymaktivitäten im Homogenat von Primärzellen und Zelllinien (Angaben in „pro ml Homogenat“). Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus 3 (Experiment 1) bzw. 2 (Experiment 2) Isolationen ± Standardfehler.

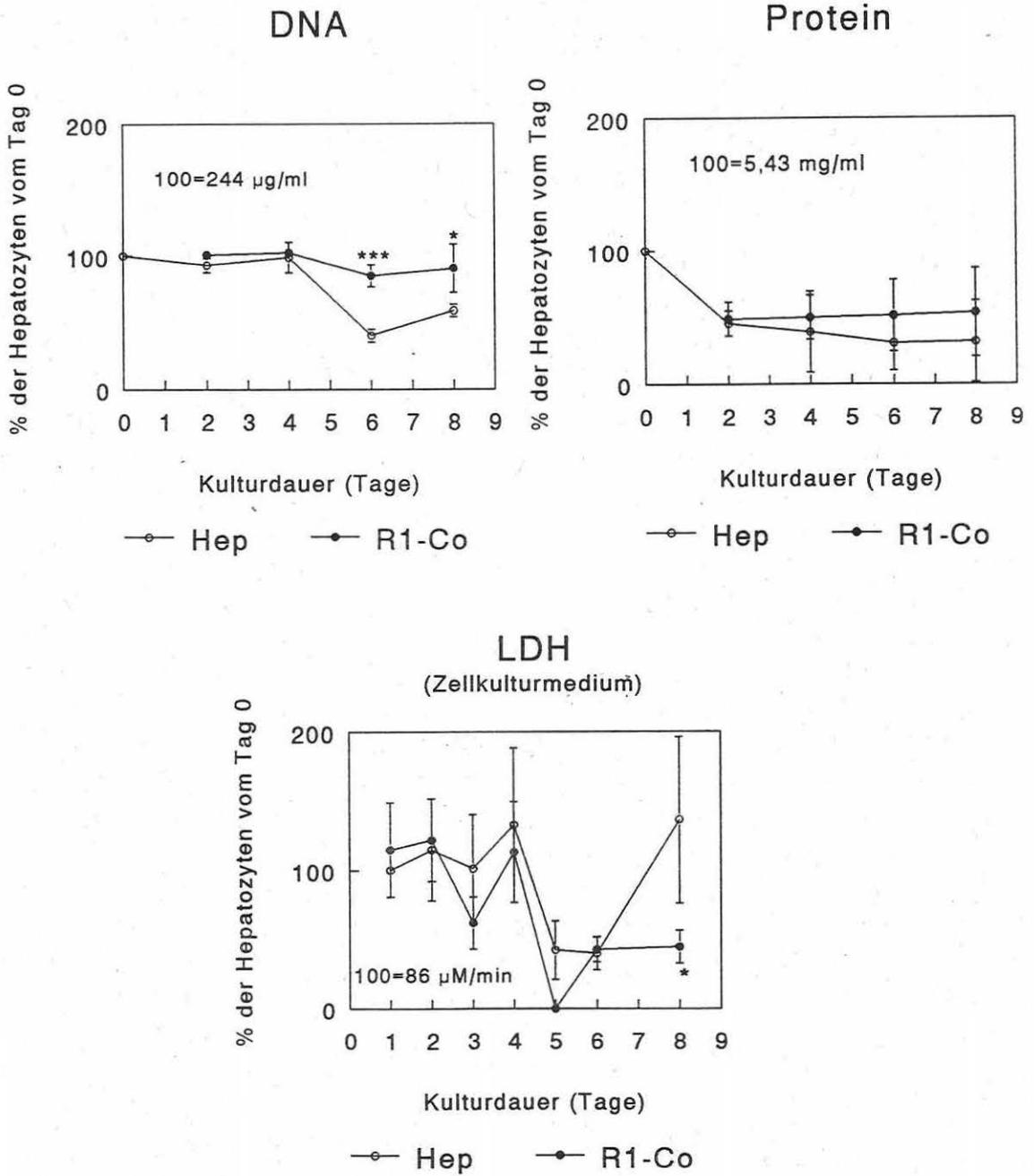


Abb. 4.3: DNA-, Proteingehalt und LDH-Abgabe ins Zellkulturmedium in Primärzellkulturen von Hepatozyten der Regenbogenforelle mit R1-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwerte aus 3 Isolationen ± Standardfehler. (Hep=reine Hepatozytenkultur, R1-Co=Hepatozytenkokultur mit R1-Zellen)

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

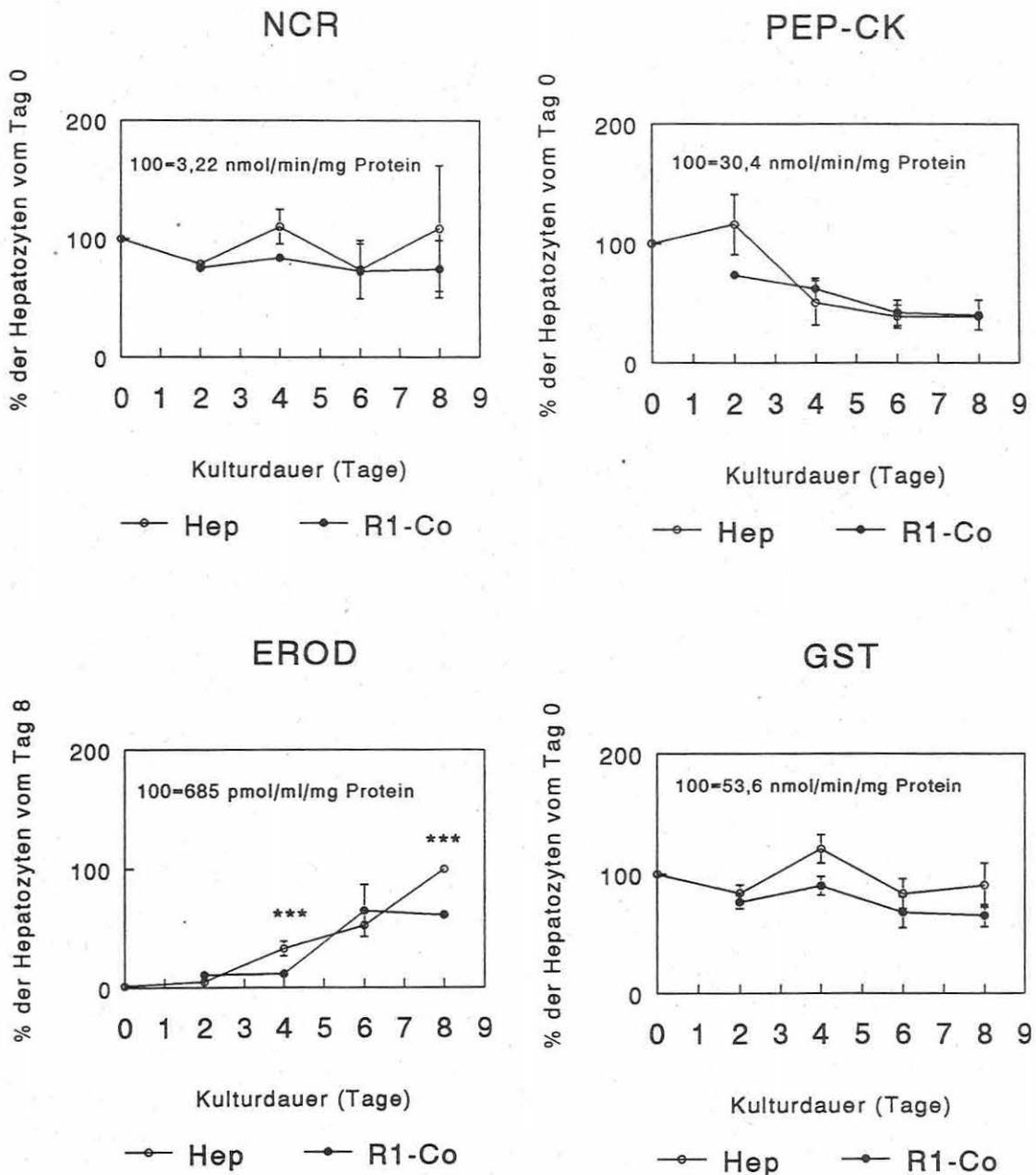


Abb. 4.4: EROD, NCR, GST und PEP-CK-Aktivität in Primärzellkulturen von Hepatozyten der Regenbogenforelle mit R1-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwerte aus 3 Isolationen  $\pm$  Standardfehler. (Hep=reine Hepatozytenkultur, R1-Co=Hepatozytenkokultur mit R1-Zellen)

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

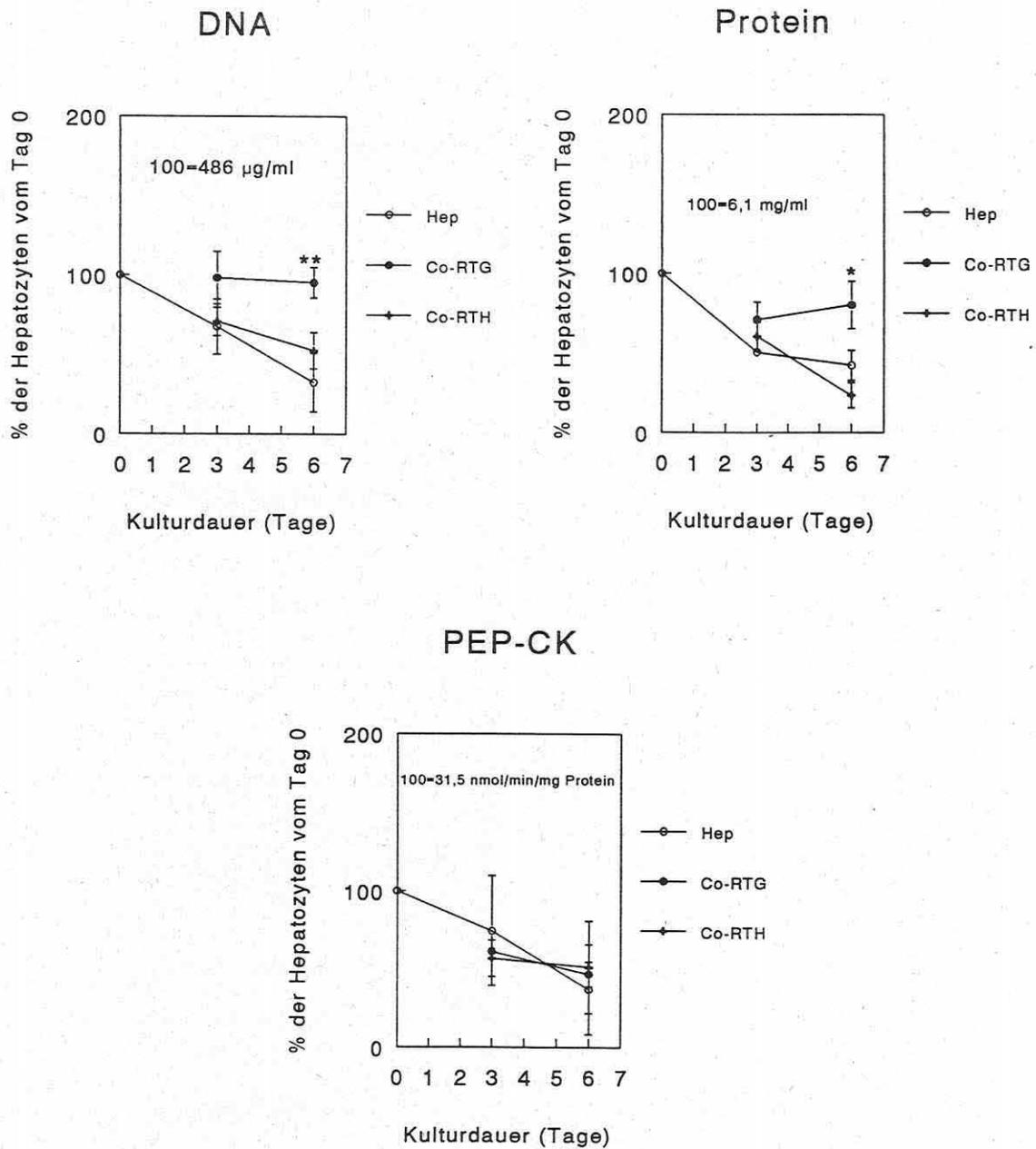


Abb. 4.5: DNA-, Proteingehalt und PEP-CK-Aktivität im Homogenat von Primärzellkulturen von Hepatozyten der Regenbogenforelle mit RTH-149- und RTG-2-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwerte aus 2 Isolationen  $\pm$  Standardfehler. (Hep=reine Hepatozytenkultur, Co-RTG=Hepatozytenkokultur mit RTG-Zellen, Co-RTH=Hepatozytenkokultur mit RTH-Zellen).

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

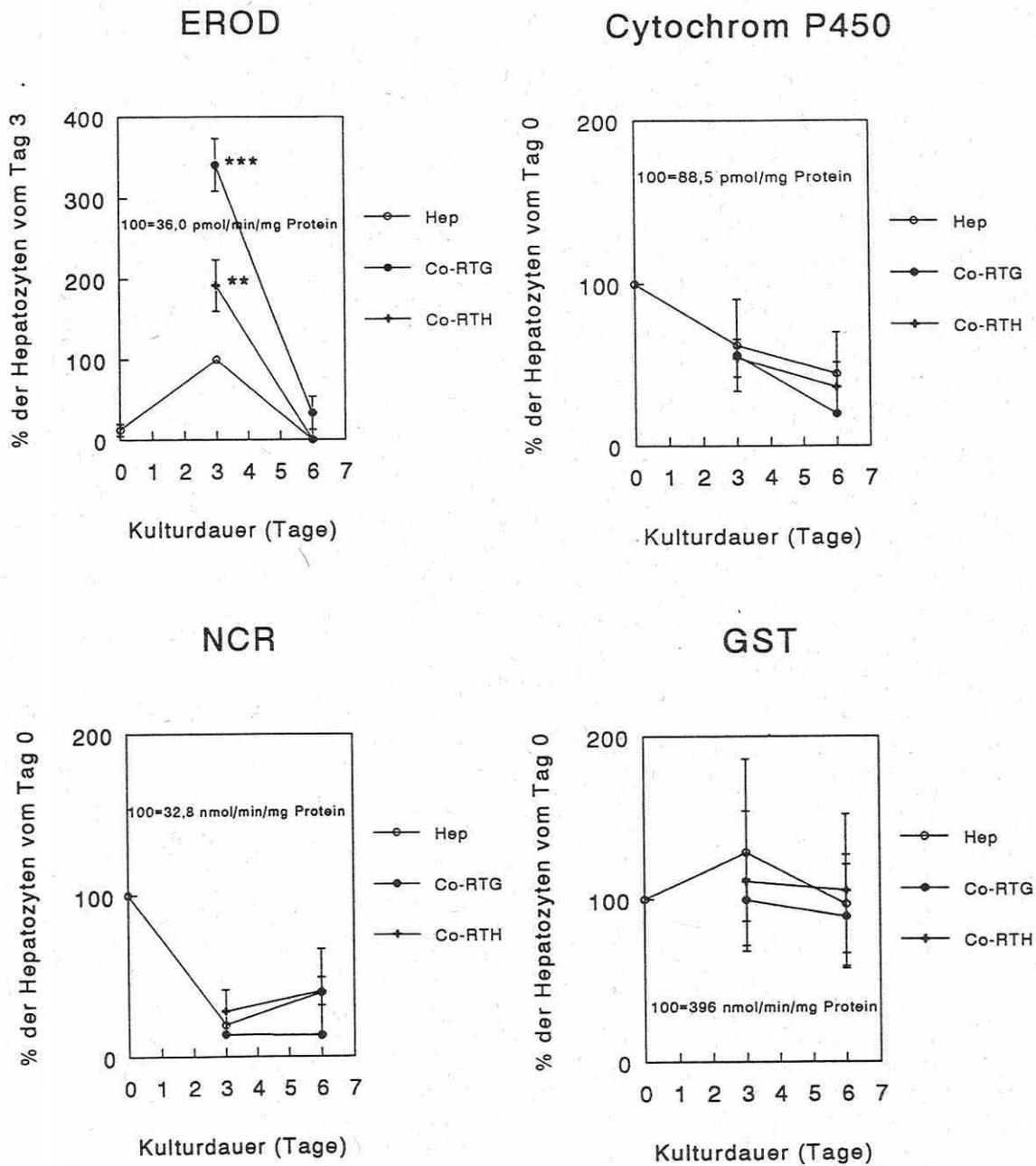


Abb. 4.6: EROD, NCR, GST und Cytochrom P450-Gehalt im Homogenat von Primärzellkulturen von Hepatozyten der Regenbogenforelle mit RTH-149- und RTG-2-Zellen. Werte repräsentieren Mittelwerte aus 2 Isolationen  $\pm$  Standardfehler. (Hep=reine Hepatozytenkultur, Co-RTG=Hepatozytenkokultur mit RTG-Zellen, Co-RTH=Hepatozytenkokultur mit RTH-Zellen).

Student's t-Test-Signifikanzniveau: \* 80 %, \*\* 90 %, \*\*\* 95 %

Keine Unterschiede zwischen reinen Hepatozytenkulturen und Kokulturen wurden für PEP-CK, NCR, GST und den zusätzlich gemessenen Gehalt von Cytochrom P450 beobachtet (Abb. 4.5 und 4.6). Die auffälligsten Effekte im Vergleich zu den anderen Zelllinien wurden bezüglich der EROD-Aktivität in der RTG-Kokultur bemerkt. Die EROD-Aktivität war am 3. Tag der Kokultur mehr als dreifach höher als in der reinen Hepatozytenkultur (Abb. 4.6). Danach fiel die EROD-Aktivität auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau zurück und war nur noch in den RTG-Kokulturen meßbar. Obwohl ähnliche Beobachtungen auch mit den RTH-Zellen gemacht wurden, war der Effekt auf EROD geringer. EROD in RTH-Kokulturen war nur, um das doppelte gegenüber der reinen Hepatozytenkultur erhöht und war wie in dieser am 6. Tag der Kultur nicht mehr nachweisbar.

Zeitlicher Verlauf von GST, NCR, PEP-CK und Cytochrom P450-Gehalt (Abb. 4.5 und 4.6): Die GST-Aktivität blieb relativ stabil während der gesamten Kulturdauer. Dagegen zeigte PEP-CK einen permanent fortschreitenden Aktivitätsverlust. Beide Ergebnisse wurden auch in der Kokultur mit R1-Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten unterschiedliche Beobachtungen für die NCR-Aktivität gemacht werden. Während sie im R1-Experiment mehr oder weniger stabil blieb, konnte im RTG/RTH-Experiment ein anfänglicher rascher Abfall bemerkt werden. Interessanterweise war ein stetig abfallender Gehalt auch für den Cytochrom P450-Gesamtgehalt zu beobachten - im Gegensatz zum Cytochrom P450-Isoenzym CYP1A1, wie dies aus der steigenden EROD Aktivität abzuleiten war.

#### 4.4 Diskussion

Die Untersuchungen in diesem Kapitel wurden mit dem Ziel durchgeführt, Primärzellkulturen von Hepatozyten aus der Regenbogenforelle biochemisch zu charakterisieren und abzuschätzen, in welchem Ausmaß verschiedene Kulturbedingungen die Expression von Biotransformationsenzymen und anderen spezifischen Leberfunktionen, die Vitalität und die Langlebigkeit der Hepatozyten beeinflussen. Da kultivierte Fischleberzellen als eine Alternative zur Toxizitätstestung mit Fischen (Braunbeck, 1993; Lindström-Seppä et al., 1993; Miller et al., 1993b; Zahn & Braunbeck, 1993) und wie Säugerhepatozyten zur Charakterisierung der Biotransformation von Chemikalien eingesetzt werden könnten (Chenery, 1987; Hansch & Zhang, 1993; Rogiers & Vercruyse, 1993; Scheepers et al., 1991), ist es nötig - vor der Durchführung von Toxizitätstests und Dosis-Wirkungs-Studien - das Verhalten und die Physiologie der Leberzellen *in vitro* genauer zu bestimmen. In diesem Kapitel werden sowohl die Aktivität der Biotransformationsenzyme, die Vitalität als auch der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf Fischleberzellen in Primärkulturen untersucht.

Zwischen den Absolutwerten der einzelnen Isolationen waren relativ große Schwankungen zu beobachten. Der Trend, d.h. die relativen zeitlichen Änderungen und die Änderungen durch die modifizierten Kulturbedingungen waren in allen Isolationen gleich. Daher wurden Enzymaktivitäten sowie der Protein-, DNA- und Cytochrome P450-Gehalt als Prozent der in frisch isolierten Hepatozyten (d.h. vom Tag 0) gemessenen Werte ausgedrückt. Allerdings war dieses für die EROD-Aktivität nicht möglich, weil vielfach in den frisch isolierten Zellen keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grunde wurde die EROD-Aktivität in Prozent der maximalen Aktivität angegeben. Um aber dennoch den Vergleich mit Studien anderer Autoren zu ermöglichen, wurde in jeder Graphik der 100 %-Wert angegeben. Nicht in allen Fällen konnten statistisch signifikante Unterschiede erzielt werden. Dies bedeutet für zukünftige Untersuchungen, daß - speziell dann, wenn Toxizität und Biotransformation untersucht werden - die Anzahl der wiederholten Ergebnisse erhöht werden muß (d.h. > 3).

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

Drei verschiedenen Kulturbedingungen und ihr Einfluß auf die Vitalität und die Aktivitäten der Biotransformationsenzyme wurden untersucht. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen orientierten sich dabei an Versuchen, die bereits mit Säugerhepatozyten durchgeführt wurden.

##### 1. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Collagen:

Der Einfluß verschiedener extrazellulärer Matrixproteine einschließlich Collagen wurde von verschiedenen Autoren (Bissel et al., 1987; Guguen-Guillouzo & Corlu, 1993; Sawada et al., 1987) in Säugerhepatozyten untersucht. Dabei konnten nur leichte Effekte auf die Anheftung und Lebensdauer und keine Verhinderung von phänotypischen Änderungen beobachtet werden. Einige wenige Studien berichten den Einfluß verschieden Anheftungs-substrate auf die Vitalität und Morphologie von Regenbogenforellenhepatozyten: Lipsky et al. (1986) verglich die Vitalität der Hepatozyten, die auf Collagen kultiviert wurden mit solchen, die auf einer kommerziell erhältlichen extrazellulären Matrix (ECM) inkubiert wurden. Dabei führte nur die ECM zu einem leichten Anstieg der Vitalität - nachgewiesen mit einer Trypan Blau-Vitalitätsfärbung. Blair et al. (1990) stellten eine gesteigerte Anheftungsrate fest, wenn die Kulturgefäße zuvor mit einem Extrakt aus der Haut der Regenbogenforelle beschichtet wurden. Keine der genannten Studien verwendete aber biochemische Parameter bei ihren Untersuchungen.

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß verschiedene Parameter positiv in Zellen beeinflußt waren, die auf Collagen beschichteten Platten kultiviert wurden: Die Collagenbeschichtung reduzierte die Ablösung der Zellen. Dies konnte durch einen höheren DNA-Gehalt im Homogenat von 8 Tage alten Primärkulturen gezeigt werden. Zusätzlich konnte eine erhöhte Vitalität durch eine signifikant niedrigere LDH-Abgabe in das Medium nach 8 Tagen Kulturdauer nachgewiesen werden. Ebenso waren das für die Leber spezifische Enzym PEP-CK und die Biotransformationsenzyme EROD und GST in Zellen von Collagen-beschichteten Gefäßen erhöht. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um den Einfluß der extrazellulären Matrix auf die Ausprägung spezifischer Funktionen zu beurteilen, da widersprüchliche Ergebnisse berichtet worden sind. So konnten Toussaint & Nederbragt (1995) keinen Effekt der ECM auf verschiedenen biochemische Parameter in Primärkulturen von Rattenhepatozyten feststellen. Ein weiteres Problem ist die Verwendung von extrazellulären Matrices von nicht nahe verwandten Spezies. Im hier durchgeführten Experiment wurde Collagen verwendet, daß aus dem Kalb stammt. Kaneko et al. (1995) beobachteten, daß verschiedene Fischzelllinien sich besser anhefteten und wuchsen, wenn Fischcollagen anstatt von Kalbscollagen verwendet wurde. Obwohl diese Untersuchungen mit Zelllinien - im Gegensatz zu den hier präsentierten Untersuchungen mit Primärkulturen - durchgeführt wurden, so zeigten sie doch klar, daß der Typ und der Speziesursprung der verwendeten ECM in Zellkulturen nicht irrelevant ist. In weiteren Untersuchungen sollten daher extrazelluläre Matrixproteine verwendet werden, die aus der Regenbogenforelle oder einer anderen Fischart isoliert wurden. Möglicherweise können dann wesentlich größere Effekte auf die Vitalität und die Ausbildung spezifischer Funktionen in den Primärkulturen beobachtet werden.

##### 2. Supplementierung des Mediums mit verschiedenen Hormonen und Kofaktoren namentlich $\alpha$ -Aminolevulin säure, Cortisol, Insulin und Transferrin:

$\alpha$ -Aminolevulin säure ist eine Vorstufe der Cytochrome. Es konnte gezeigt werden, daß der Zusatz dieser Synthesevorstufe zum Medium den Cytochrom P450-Gehalt während der ersten 24 Stunden in der Kultur von Rattenhepatozyten stabilisiert (Paine et al., 1982). Während Glucocorticoide dem Medium zugesetzt wurden, um die Induktionsantwort von Cytochrom P450 zu steigern (Devaux et al., 1992), konnte für Insulin und Transferrin eine Erhaltungsfunktion für die Funktionalität und Lebensdauer von Hepatozyten in Serum-freiem Kulturmedium gezeigt werden (Castell et al., 1983; Sawada et al., 1987).

Der einzige Effekt, der in diesem Kapitel für die kultivierten Fischhepatozyten bei Verwendung des supplementierten Kulturmediums beobachtet werden konnte, war eine reduzierte LDH-Abgabe in das Medium, d. h. eine gesteigerte Vitalität und eine leicht erhöhte GST-Aktivität. Sowohl die Anheftung als auch die Ablösung von Zellen waren bei Verwendung von Mediumzusätzen nicht verändert. EROD dagegen zeigte sogar eine verringerte Aktivität in 8 Tage alten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Die leicht gesteigerte Vitalität bei Verwendung des mit Insulin, Cortisol,  $\alpha$ -Aminolevulinsäure und Transferrin supplementierten Mediums könnte die Ursache in einem reduzierten Abbau oder in einer Bereitstellung von wichtigen Kofaktoren haben, die durch den Zusatz der entsprechenden Metabolite und Signale erreicht wird. Auf der anderen Seite könnten Hormone die Synthese von Phase 1-Enzymen negativ regulieren. So zeigte CYP1A1 (nachgewiesen über die zugehörige Enzymaktivität EROD) eine verringerte Aktivität bei Inkubation mit dem u.a. durch Hormone angereichertem Medium.

### 3. Kokultur von Hepatozyten mit R1-, RTH-149- und RTG-2-Zellen:

Für Säuger wurde berichtet, daß die Kokultur in der Lage ist, spezifische Leberfunktionen in den kultivierten Hepatozyten zu unterstützen - abhängig vom Zelltyp bzw. der Zelllinie, die in der Kokultur eingesetzt wurde. Offensichtlich haben näher verwandte Zellen, d.h. Zellen, die vom gleichen Organ stammen, eine größere Potenz, eine entsprechende für die Hepatozyte zuträgliche Mikroumgebung zu schaffen. Dies konnte von (Utesch & Oesch, 1992; Utesch et al., 1991) gezeigt werden, die eine bessere Stabilisierung von verschiedenen Phase 1- und Phase 2-Enzymen beobachteten, wenn nicht-parenchymale Rattenleberepithelzellen (NEC) einer bestimmten Passage anstelle der etablierten C3H-Zelllinie in der Kokultur verwendet wurden.

Von Utesch et al. (1991) gemachte Beobachtungen, daß verschieden Zelltypen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Hepatozyten ausübten, konnten durch die hier vorgestellten Untersuchungen mit R1-, RTH-149- und RTG-2-Zellen bei der Kokultur mit Forellenhepatozyten bekräftigt werden. Die drei verschiedenen Zelllinien zeichneten sich durch eine unterschiedliche Fähigkeit aus, die Vitalität und die Ausprägung spezifischer Leberfunktionen in Primärkulturen zu unterstützen. In der R1-Kokultur zeigten höhere DNA-Gehalte der Homogenate eine reduzierte Zellablösung bei verlängerter Kulturdauer an. In Übereinstimmung damit konnte eine erhöhte Vitalität nach 8 Tagen in der Kokultur im Vergleich zur reinen Hepatozytenkultur festgestellt werden - nachgewiesen durch eine verringerte LDH-Aktivität im Zellkulturmedium. Der einzige weitere Parameter, der in der Kokultur geändert war, war die EROD-Aktivität, die signifikant verringerte Aktivitäten aufwies (Abb. 4.3 und 4.4).

Neben der Verhinderung der Zellablösung zeigte die RTH-Zelle einen Einfluß auf die EROD-Aktivität, die in Kokulturen nach 3 Tagen Kulturdauer etwa doppelt so hoch war wie in reinen Hepatozytenkulturen. Einen ähnlichen Einfluß hatte die Kokultur mit RTG-Zellen. Die RTG-Zellen verhinderten die Ablösung der Hepatozyten in viel größerem Ausmaß wie die RTH-Zellen, so daß DNA- und Proteingehalt in den kultivierten Zellen den der frisch isolierten Zellen entsprachen (Abb. 4.5). Dies konnte auch durch die mikroskopische Beobachtung der Zellkulturen bestätigt werden, die zeigten, daß die Hepatozyten in der Kokultur Aggregate bildeten und fest an die RTG-Zellen angeheftet waren (Abb. 4.7). Der beobachtete Anstieg der EROD-Aktivität konnte nicht auf einen selektiven Abbau bestimmter Proteine zurückgeführt werden, da der Proteingehalt in Kokulturen mehr oder weniger stabil war bzw. in weit aus geringerem Maße abfiel als ein Anstieg der EROD-Aktivität zu verzeichnen war. Daher müssen aktive Prozesse bei der Erhöhung der EROD-Aktivität beteiligt sein. Diese könnte eine gesteigerte Transkription des CYP1A1-Gens oder eine Stabilisierung von CYP1A1-mRNA bzw. -Protein als Ursache haben, die zu einer intrazellulären Akkumulation des Enzyms führen könnten. Eine Ursache für die Steigerung

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

der EROD-Aktivität könnten bestimmte Zelloberflächenproteine der RTG-Zellen aber auch lösliche Faktoren sein, die von den Hepatozyten erkannt werden und ihren Differenzierungsgrad, d.h. die Expression bestimmter Gene, beeinflussen.

Die EROD-Aktivität war in RTG-Kokulturen am Tag 3 mehr als dreimal so hoch wie in der reinen Hepatozytenkultur. Außerdem konnte sie auch noch nach 6 Kulturtagen nachgewiesen werden, während sie in RTH-Kokulturen und reinen Hepatozytenkulturen nicht mehr meßbar war (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse unterstützen offenkundig die von Utesch et al. (1991) gemachten Beobachtungen, daß der in der Kokultur von Hepatozyten verwendete zweite Zelltyp von Bedeutung für die Fähigkeit zur Interaktion mit der Hepatozyte ist. Im Gegensatz zu Utesch et al. (1991) konnte hier beobachtet werden, daß die RTG-Zelle, die ursprünglich aus der Gonade der Regenbogenforelle isoliert wurde, eine höhere Effektivität bei der Unterstützung spezifischer Funktionen und der Verhinderung der Zellablösung hatte wie die beiden anderen Zelllinien R1 und RTG-149. Die beiden letztgenannten Zelllinien stammen aus der Leber der Regenbogenforellen und man könnte daher annehmen, daß sie eher in der Lage sein könnten mit den Primärhepatozyten zu interagieren und diese zu beeinflussen.

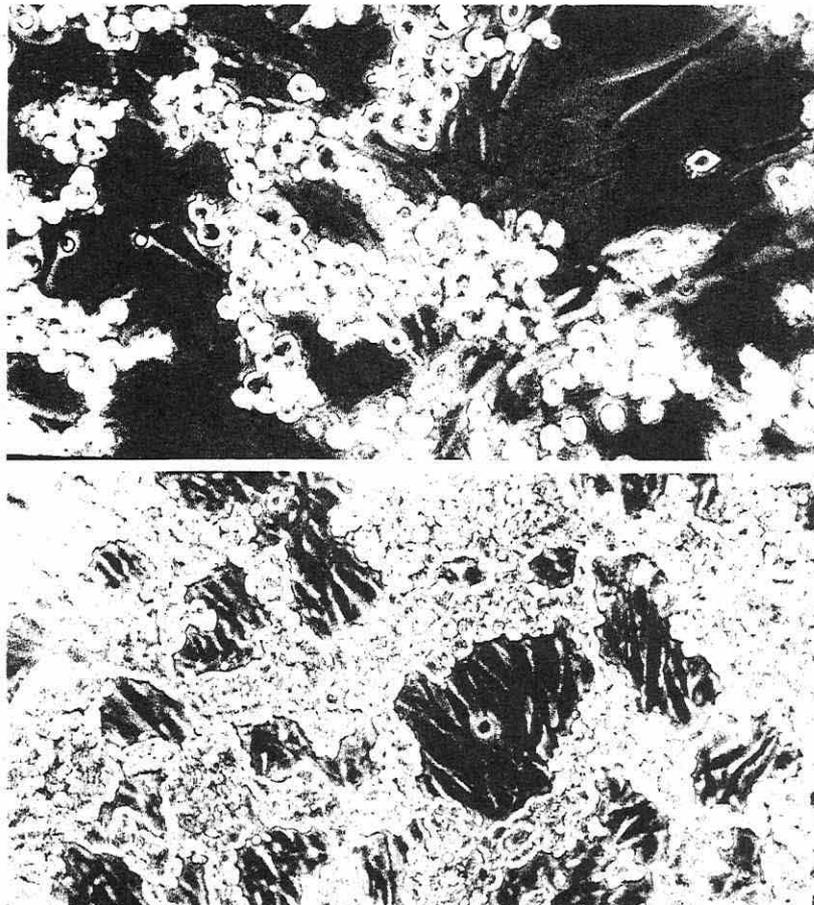


Abb. 4.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von RTG-2-Kokulturen mit Hepatozyten aus der Regenbogenforelle (300 x). Oben: 24 h nach der Aussaat der Hepatozyten. Unten: 48 h nach der Aussaat der Hepatozyten. Die Fibrozyten-ähnlichen Zellen stellen die RTG-Zellen dar, die von Hepatozyten überlagert werden.

Die Experimente mit den verschiedenen Modifikationen der Kulturbedingungen demonstrieren eindeutig, daß nahezu alle untersuchten Systeme - Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen, Supplementierung des Mediums und Kokultur mit verschiedenen Zelllinien - zumindest einen geringen (Collagenbeschichtung, Mediumsupplementierung) oder aber deutlichen (RTG-Kokultur) Einfluß auf die Vitalität und Anheftung der Hepatozyten hatten. Bezüglich der Biotransformationsenzymaktivitäten konnten die auffallendsten Effekte in der RTG-Kokultur beobachtet werden. Auch wenn höhere EROD- und GST-Aktivitäten in Zellen von Collagen-beschichteten Kulturgefäßen gefunden werden konnten, so konnte jedoch kein der RTG-2 Zelle vergleichbarer Effekt - die dreifach erhöhte EROD-Aktivität nach 3 Tagen Kulturdauer - beobachtet werden.

Die Bedeutung, die Zell-Zell-Interaktionen auf die Ausprägung spezifischer Funktionen in der Leberzelle hatten, wurde auch durch den Einfluß der Aggregatbildung auf die EROD-Aktivität verdeutlicht. Eine fehlende Aggregation führte immer zu einem Ausfall der EROD-Aktivität, während die übrigen untersuchten Parameter (NCR, PEP-CK und Cytochrom P450-Gehalt) in nicht aggregierten und aggregierten Primärkulturen in der gleichen Größenordnung nachweisbar waren (Abb. 4.2). Es ist auffällig, daß sowohl hier als auch bei den Untersuchungen mit Kokulturen, das am stärksten betroffene Enzym das Cytochrom P450-Isoenzym CYP1A1 war. Für die Erhaltung bzw. die Ausbildung substantieller Mengen dieses Isoenzyme spielen offensichtlich Zell-Zell-Interaktionen - sei es zwischen gleichen Zellen oder zwischen verschiedenen Zelltypen - eine bedeutende Rolle.

Ein genereller Aspekt kann für alle der durchgeführten Experimente formuliert werden: Der zeitabhängige Anstieg der EROD-Aktivität, der im Widerspruch zu allen Ergebnissen steht, die mit Säugerhepatozyten gemacht wurden. Während in reinen Säugerhepatozytenkulturen ein rascher Verlust von CYP1A1 und seinen entsprechenden Enzymaktivitäten beobachtet werden konnte, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse und die von (Masfaraud et al., 1992a; Pesonen & Andersson, 1991; Vaillant et al., 1989) einen Anstieg der EROD bzw. der ECOD Aktivität mit verlängerter Kulturdauer. Während die oben angesprochenen Untersuchungen, welche alle Fischhepatozyten der Regenbogenforelle untersuchten, einen Abfall oder eine Stabilisierung von EROD bzw. ECOD nach 2 oder 3 Tagen in Kultur zeigten, konnten hier zwei verschiedene Beobachtungen gemacht werden - abhängig davon, welche Fische für die Primärkultur benutzt wurde. Die Experimente zur Collagenbeschichtung, Mediumsupplementierung und zur R1-Kokultur wurden jeweils mit Fischen aus einer Lieferung durchgeführt, während die Experimente zur RTG- und RTH-Kokulturen mit Fischen aus einer anderen Lieferung (9-12 Monate später) durchgeführt wurden. Die von der Firma SAXENSTÖR erhaltenen Fische stammten nicht aus eigener Zucht, sondern wurden entsprechend von verschiedenen Züchtern bezogen und bis zum Verkauf gehältert. D.h. daß durchaus Fische aus verschiedenen Populationen, die unter Umständen unter verschiedenen Bedingungen aufgezogen wurden, verwendet worden sein könnten. Hiermit ließen sich die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der EROD erklären: In den ersten Experimenten wurde ein stetiger Anstieg der Aktivität beobachtet. Im RTG/RTH-Experiment dagegen konnte ein Anstieg nur bis zum dritten Tag beobachtet werden. Danach sank die Aktivität bis auf ein nicht meßbares Niveau ab. Unterschiede zwischen dem R1- und dem RTG/RTH-Experiment konnten auch für die NCR-Aktivität sowohl in reinen Hepatozyten- als auch in Kokulturen beobachtet werden: Es zeigten sich stabile Werte im R1- und ein Absinken im RTG/RTH-Experiment. Diese Unterschiede waren aber offensichtlich ein Ergebnis, das hauptsächlich auf die geringen anfänglichen Aktivitäten in den Hepatozyten, die für den R1-Versuch isoliert wurden (3,2 nmol/min/mg Protein),

#### 4. Vitalität und Biotransformationsenzyme von Forellenhepatozyten

zurückzuführen war, während die anfänglichen Aktivitäten in frisch isolierten Hepatozyten im RTG/RTH-Versuch 10fach höher lagen (32,8 nmol/min/mg Protein).

Gegensätzlich zur EROD-Aktivität verhielt sich der Gesamtgehalt von Cytochrom P450: Der Gehalt an P450 sank sehr rasch mit fortgesetzter Kulturdauer - ein Phänomen, das in gleicher Weise auch für Säugerhepatozytenkulturen beobachtet wurde. Keine Effekte durch die Kokultur von RTG- oder RTH-Zellen im Hinblick auf eine Stabilisierung von P450 konnten aufgezeigt werden, obwohl für Primärkulturen von Säugerzellen Kokulturen offensichtlich den Verlust von P450 verhindern (Donato et al., 1990, 1991; Utesch et al., 1991). Der Gesamtgehalt von Cytochrom P450, der alle Isoenzyme einschließlich CYP1A1 umfaßt, muß aber nicht notwendigerweise mit dem Gehalt eines spezifischen Isoenzymes wie dem CYP1A1 korreliert sein. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren eindeutig den selektiven Effekt auf das CYP1A1 Isoenzym.

Die Untersuchungen, die in diesem Kapitel dargestellt wurden, waren eine Pilotstudie über den Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf die Vitalität und die Ausprägung spezifischer Funktionen von Hepatozyten der Regenbogenforelle. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zusammensetzung des Mediums, die extrazelluläre Matrix und die Kokultur mit verschiedenen Zelltypen die Vitalität und die Anheftung von primären Fischleberzellen steigern kann. Von den untersuchten Kulturbedingungen konnten der auffallendste Effekt bei den Aktivitäten des Phase 1-Biotransformationsenzyme EROD bei Kokultur mit der RTG-Zelllinie festgestellt werden. Zukünftige Experimente, die die verschiedenen Methoden zur Erhaltung von Vitalität und spezifischen Funktionen kombinieren könnten, könnten zu einer weiteren Optimierung der Kulturbedingungen für Fischhepatozyten führen, die mehr den *in vivo*-Eigenschaften angenähert sind. Dies würde die Aussagekraft bei der Verwendung in Toxizitäts- und Biotransformationsstudien erhöhen. Die Unterschiede zwischen den Kokulturen mit den drei verschiedenen Zelllinien und der Einfluß der Aggregatbildung auf die EROD-Aktivität deuten dabei an, daß eine der wichtigsten Komponenten für die Erreichung eines *in vivo*-ähnlichen biochemischen Zustandes die Etablierung von entsprechenden Zell-Zell Interaktionen sein dürfte.

## 5. Induktion von CYP1A1 in Leberzellkulturen der Regenbogenforelle:

### Konzentrations-Wirkungsbeziehungen und Nachweis der Belastung einer Umweltprobe mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen

#### 5.1 Zusammenfassung

Konzentrations-Wirkungskurven für die Induktion von CYP1A1 mit Methylocholanthren (MC), Benzo(a)pyren (BAP), Benz(a)anthracen (BAT) und  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) im Bereich von 3 bis 8000 nM wurden mit Kokulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle zusammen mit der RTG-Zelllinie aufgestellt. Aus den Induktionsdaten wurden  $EC_{50}$ -Werte und relative maximale Induktionswerte berechnet. Für die durch Messung der EROD-Aktivität ermittelten  $EC_{50}$ -Werte konnte eine Übereinstimmung mit publizierten Ah-Rezeptoraffinitätsdaten beobachtet werden. Die unterschiedliche Induktionskapazität der untersuchten PAHs (MC>BAP>BNF $\geq$ BAT) wird als Folge einer sterischen Interaktion zwischen Ah-Rezeptor/Arnt (Kerntranslokator)/Substrat-Komplex und dem CYP1A1-Promotor oder einer unterschiedlichen toxischen Wirkung diskutiert.

#### 5.2 Einleitung

Die toxische Wirkung von polyaromatischen (chlorierten) Kohlenwasserstoffen (PAHs) auf Fische wird sowohl durch toxikokinetische als auch durch toxikodynamische Faktoren bestimmt. Zu den toxikokinetischen Faktoren zählt man die Aufnahme von Stoffen über die Kiemen, die Resorption aus der Nahrung und die Elimination der Substanzen aus dem Körper. Die toxikokinetischen Eigenschaften eines aromatischen Kohlenwasserstoffs sind abhängig von seiner Größe (Membrangängigkeit) und Lipophilität und beeinflussen seine Bioakkumulation in Organen und Geweben (Streit, 1992). Die Bioakkumulation ist dabei entscheidend für die Ausbildung substantieller Konzentrationen für die Auslösung toxikodynamischer Effekte. Die Toxikodynamik wird durch die Bindung von Stoffen an Zellbestandteile (Proteine, DNA u.a.), Hemmung von Enzymen, Beeinflussung der Membranstruktur und -potential u.a. mit weitreichenden Folgen für die physiologische Funktionalität von Zelle und Organ bis hin zu nekrotischen Erscheinungen bestimmt.

Die Biotransformation von PAHs durch CYP1A1 beeinflusst sowohl deren Toxikokinetik als auch deren Toxikodynamik. Die Oxidation durch die CYP1A1-Monooxygenase und die nachfolgende Konjugation an niedermolekulare Substanzen erhöht die Polarität der Substrate und führt zu einer gesteigerten Elimination. Die Reduzierung der Biotransformation durch geeignete Inhibitoren kann die Akkumulation der Substanzen im Fisch erhöhen (de Bruijn et al., 1993; Sijm, 1992; Sijm et al., 1993a, b). Im Gegensatz dazu steigert die Induktion von CYP1A1 die Metabolisierung seiner Substrate (Förlin & Haux, 1985).

Die Metabolisierung durch CYP1A1 und andere P450-Monooxygenasen kann aber auch zu einer Aktivierung, d.h. zur Entstehung von Substanzen mit einer erhöhten Toxizität führen (Goldstein & Faletto, 1993; Ingelman-Sundberg, 1980; Parke, 1987).

## 5. Induktion von CYP1A1

CYP1A1 wird in Fischen wie in Säugetieren konstitutiv in relativ kleinen Mengen synthetisiert, ist aber durch verschiedene aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine, PCBs (polychlorierte Biphenyle) und andere Stoffe induzierbar (Goksøyr & Förlin, 1992). Diese Induzierbarkeit kann für zwei verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden:

1. Zum Nachweis einer Belastung von Gewässern (Biomonitoring): Im aquatischen Bereich ist die Induktion von CYP1A1 in der Leber häufig zum Nachweis einer Gewässerbelastung mit verschiedenen aromatischen Fremdstoffen (siehe Abschnitt 3.2) eingesetzt worden. Die Messung der CYP1A1-Induktion als Indikator für eine Belastung bietet neben dem Verzicht einer aufwendigen chemischen Analytik die Möglichkeit der summarischen Berücksichtigung der biologischen Wirkungskomponente und liefert daher Ergebnisse mit einer größeren biologischen Relevanz als reine chemische Analysedaten. Der Einsatz von Zellkulturen im Biomonitoring ist dabei bisher nur in einer einzigen Publikation beschrieben (Lindström-Seppä et al., 1993).

2. Zur Charakterisierung des Risikopotentials von Chemikalien: Da die Metabolisierung durch CYP1A1 sowohl die Toxizität als auch die Bioakkumulation von PAHs beeinflussen kann, könnte die Kenntnis ihrer Induktionskapazität und ihres Metabolismuswichtige Informationen für die Einschätzung des Risikos eines Umweltschadstoffes und dessen Verbleib in aquatischen Ökosysteme liefern. Bei ausreichender Datenmenge könnten auch Vorhersagen zu experimentell noch nicht untersuchten Stoffen durch QSARs (Quantitative structure activity relationships) unternommen werden. Die mit QSARs gewonnenen Informationen könnten direkt bei der Entwicklung neuer Chemikalien berücksichtigt werden, um die Produktion und den Eintrag von umweltschädlichen Stoffen zu vermeiden (Schüürmann & Marsmann, 1991a, b).

Die Verwendung von Zellkulturen im Biomonitoring und bei der Charakterisierung der Induktionseigenschaften einer Chemikalie bietet verschiedene Vorteile: Ihr Einsatz im Biomonitoring ermöglicht den Verzicht auf aufwendige Gewässerbefischungen und schließt zugleich Einflüsse aus, die durch unterschiedliche Nahrungs-, Lebensgewohnheiten und Wanderungsbewegungen einer Fischart hervorgerufen werden können. Daneben reduziert man durch den Einsatz von Leberzellkulturen für die Charakterisierung von Chemikalien die Anzahl der für die Untersuchung benötigten Tiere erheblich. Die Kosten und der Zeitaufwand für einen Versuch werden dadurch wesentlich verringert, da mit wenigen Zellisolationen bereits eine Vielzahl von Konzentrationen und Substanzen untersucht werden können.

In diesem Kapitel sollen die Möglichkeiten von Primärzellkulturen aus Hepatocyten der Regenbogenforelle, sowohl bei der Charakterisierung verschiedener PAHs als auch beim Biomonitoring eingesetzt zu werden, evaluiert werden. Mit dieser Problemstellung wurde bisher keine Untersuchung mit Primärkulturen von Fischen durchgeführt. Zur Untersuchung der PAH-Wirkung wurden exemplarisch für nachfolgend beschriebene 4 verschiedene, für ihre Induktion von CYP1A1 aus der Literatur bekannte Substanzen Dosis- bzw. Konzentrations-Wirkungskurven aufgestellt.

1. Methylcholanthren besitzt eine den Dioxinen vergleichbare hohe Induktionskapazität (Poland & Knutson, 1982) (da der Umgang mit Dioxinen spezielle Laboratorien und Sicherheitsbestimmungen erfordert, wurde diese Substanzklasse hier nicht untersucht).

2.  $\beta$ -Naphthoflavon, ein Naturstoff aus Kreuzblütlern mit antikanzerogener Wirkung, ist eine der häufigsten eingesetzten Substanzen zum Nachweis der CYP1A1-Induktion (Andersson et al., 1985; Celandier & Förlin, 1991; Haasch et al., 1993b; Miller et al., 1989; Pesonen & Andersson, 1991; Vaillant et al., 1989) und wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung von CYP1A1 für die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt.

3. Benzo(a)pyren und Benz(a)anthracen sind ubiquitäre Umweltschadstoffe, die als Rückstände bei der Verbrennung von organischem Material entstehen. Sie sind wie Methylcholanthren als karzinogene und genotoxische Substanzen beschrieben, die durch Metabolisierung über CYP1A1 aktiviert werden (Marquardt & Schäfer, 1994b). Außerdem wurden zur Demonstration des Nachweises einer Belastung mit organischen Chemikalien Primärzellkulturen mit dem wässrigen Eluat von Haldenmaterial einer Abfallhalde des Mansfelder Reviers inkubiert.

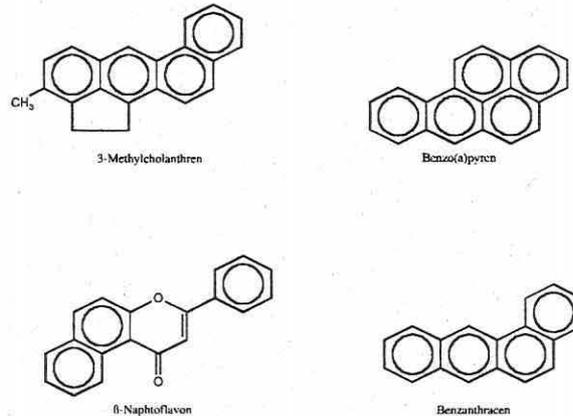


Abb. 5.1: Strukturformeln der in diesem Kapitel eingesetzten CYP1A1-Induktoren.

### 5.3 Ergebnisse

#### 5.3.1 Konzentrations-Wirkungskurven zur CYP1A1-Induktion

Zum Nachweis der unterschiedlichen Induktionskapazität von verschiedenen für CYP1A1 als Induktor wirkenden Substanzen wurden Hepatocyten aus der Regenbogenforelle in Kokultur mit RTG-Zellen für insgesamt 3 Tage kultiviert. Nach 24 Stunden, nachdem sich die Zellen angeheftet hatten und erste Aggregationen zu beobachten waren, wurden die CYP1A1-Induktoren in Konzentrationen von 3 bis 2000 bzw. 8000 nM zugesetzt. Nach 48 h Inkubation wurde die Induktion von CYP1A1 durch Anstieg der repräsentativen Enzymaktivitäten EROD und ECOD oder durch direkten Nachweis des CYP1A1-Proteins mit ELISA oder Western Blot im Homogenat überprüft.

Zunächst wurden Hepatozyten bis zu einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  mit BAP, MC und BNF inkubiert. Bei einem Western Blot mit den Homogenaten der Zellkulturen konnte CYP1A1 nur bei der höchsten applizierten Konzentration, 2  $\mu\text{M}$ , nachgewiesen werden (Abb. 5.2). Während bei MC eine klare Bande des CYP1A1 im Western Blot zu beobachten war, konnte für BNF keine Induktion mit dem Western Blot und für BAP nur eine geringe Induktion (sehr schwache Bande in Spur 5, Abb. 5.1) nachgewiesen werden. Da bei Konzentrationen bis 2  $\mu\text{M}$  nur eine geringe Induktion mit BAP und keine mit BNF im Western Blot zu beobachten war, wurde in allen nachfolgenden Experimenten die Konzentration auf 8  $\mu\text{M}$  erhöht. Höhere Konzentrationen wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit der Induktoren nicht untersucht. Wegen der besseren Quantifizierbarkeit wurde in allen weiteren Experimenten für den immunologischen Nachweis die ELISA-Technik gewählt.

## 5. Induktion von CYP1A1

Die sich aus den Ergebnissen des Western Blots ergebende Rangordnung der unterschiedlichen Induktionskapazität MC>BAP>BNF konnte auch in den übrigen Versuchen, bei denen CYP1A1 über Enzymaktivität und ELISA nachgewiesen wurde, bestätigt werden. Dabei wurden jeweils 6 verschiedene Konzentrationen (8000, 2000, 500, 125, 31, 3,9 nM sowie eine Kontrolle) der CYP1A1-Induktoren MC, BAP, BAT und BNF untersucht. Diese relativ geringe Anzahl von Konzentrationen pro Substanz wurde gewählt, um möglichst viele Substanzen mit einer Zellisolation untersuchen zu können, da sich zeigte, daß zwischen verschiedenen Zellisolationen sehr große Schwankungen bestanden und so eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Substanzen gegeben war.

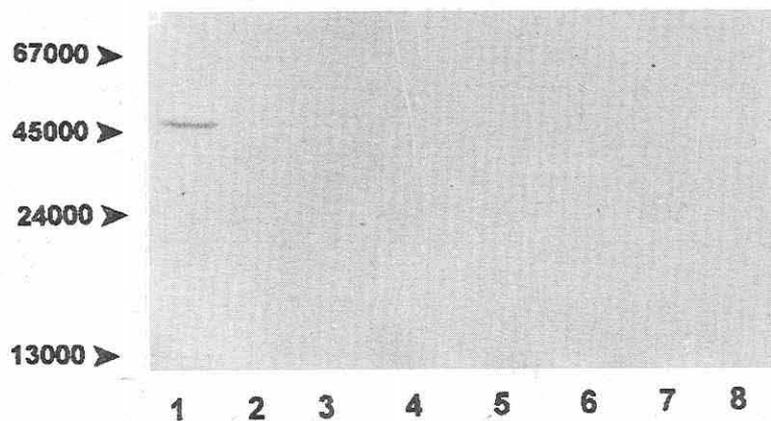
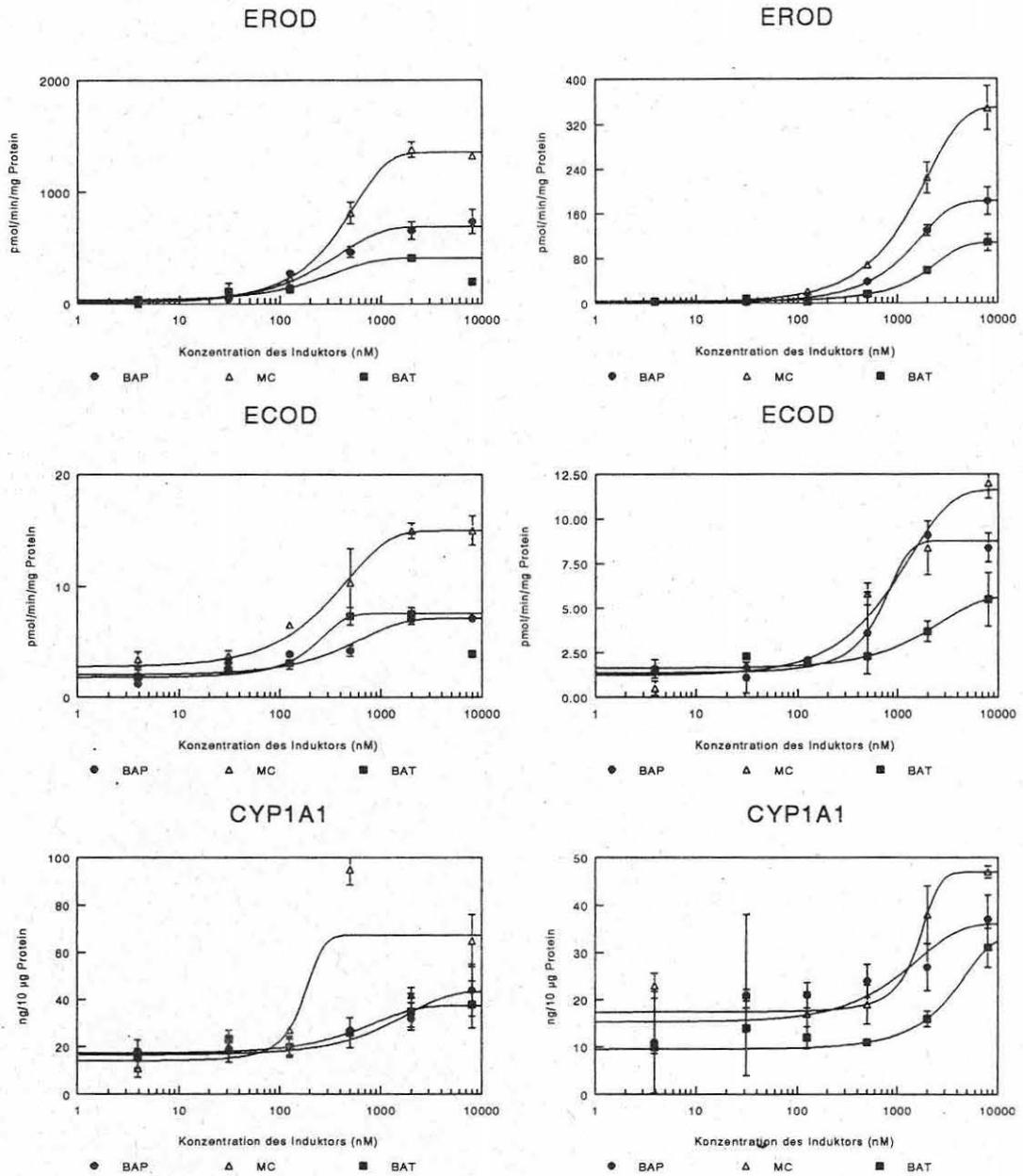


Abb. 5.1: Nachweis der Induktion von CYP1A1 im Homogenat von Hepatozyten der Regenbogenforellen durch Western Blot. Spur 1: 2 µM MC; Spur 2: 0,5 µM MC; Spur 3: 125 nM MC; Spur 4: 61 nM MC; Spur 5-8: wie Spur 1-4 jedoch Zellen mit BAP inkubiert. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Zellen wurden insgesamt 48 h mit MC (Methylcholanthren) oder BAP (Benzo(a)pyren) inkubiert.

Im Gegensatz zum Western Blot konnten dabei bereits für die geringen Konzentrationen von 31 und 125 nM mit allen 3 Meßmethoden (EROD, ECOD, CYP1A1-ELISA) eine verstärkte Bildung von CYP1A1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus 4 verschiedenen Zellisolationen wurden zunächst einzeln ausgewertet und sind in Abb. 5.3 und 5.4 dargestellt. Die Induktion von CYP1A1 zeigte ein typisches Dosis- bzw. Konzentrations-Wirkungsverhältnis (Peakall, 1994), so daß sich die Ergebnisse durch eine sigmoide Kurve darstellen ließen. Während die Abweichungen vom sigmoiden Kurvenverlauf für EROD und ECOD relativ gering waren, war diese Darstellung für den CYP1A1-ELISA nur mit großen Schwierigkeiten möglich. Die einzelnen Punkte lagen z.T. weit neben der berechneten Kurve (Isolation 1, Abb. 5.3). Bei einigen Chemikalien und in einigen Isolationen trat bei den höchsten Konzentrationen eine Abnahme von CYP1A1-Gehalt und -Aktivität auf. Da die Hemmung bei hohen Konzentrationen möglicherweise auf einen toxischen Effekt der applizierten Substanzen zurückzuführen war, wurden diese Werte nicht mit in die Kurvenberechnung einbezogen.

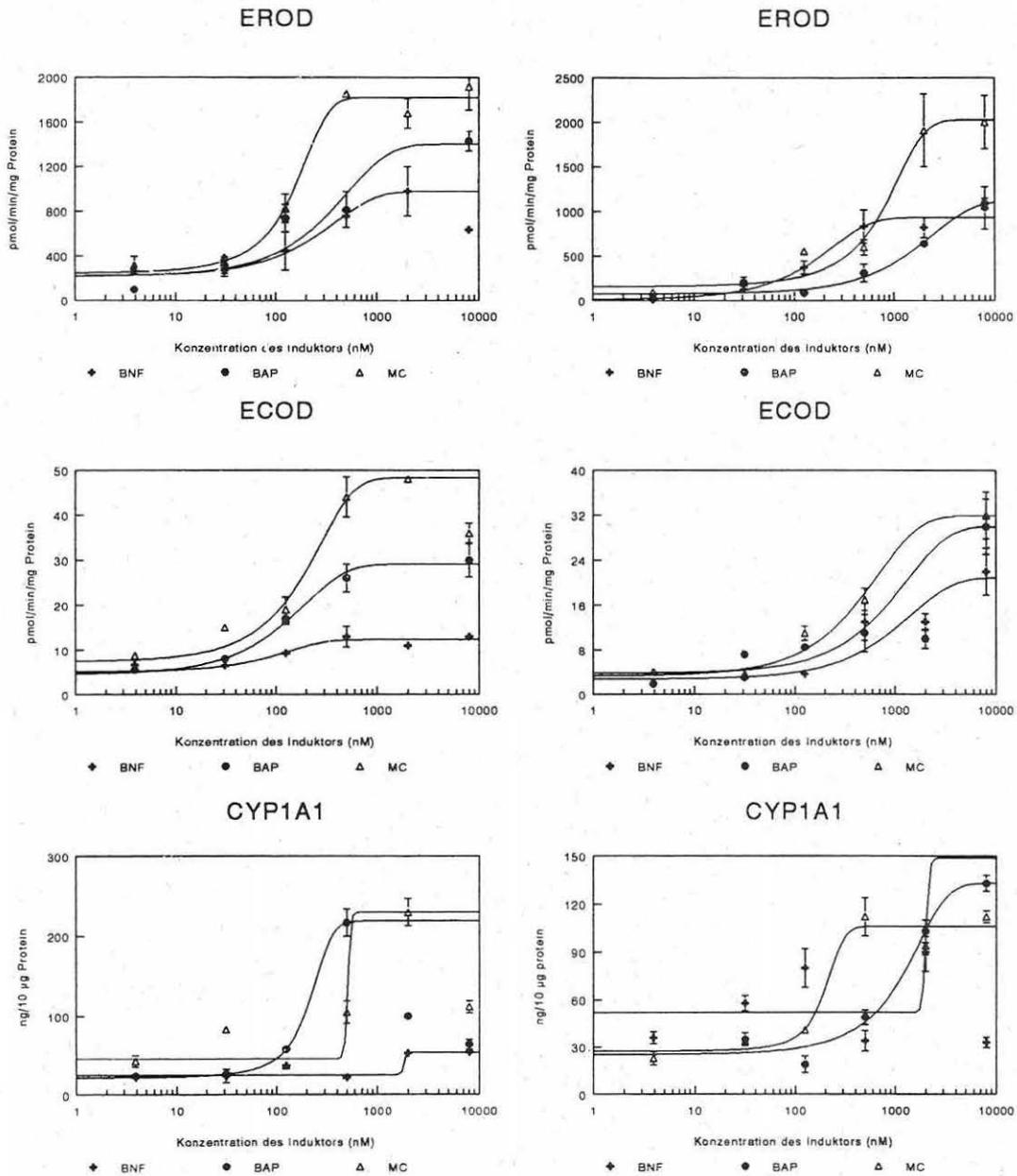


## Isolation 1

## Isolation 2

Abb. 5.3: Induktion von EROD-, ECOD-Aktivität und immunologisch (ELISA) bestimmter CYP1A1-Menge durch verschiedene Konzentrationen von BAP (Benzo(a)pyren), MC (Methylcholanthren) und BAT (Benz(a)anthracen). Gezeigt werden die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Leberzellisolationen (Isolation 1 und 2) der Regenbogenforelle. Alle Messungen wurden mit Zellhomogenat (10000 g Überstand) bzw. mit der Mikrosomenfraktion (ELISA) durchgeführt. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (n=3).

## 5. Induktion von CYP1A1



### Isolation 3

### Isolation 4

Abb. 5.4: Induktion von EROD-, ECOD-Aktivität und immunologisch (ELISA) bestimmter CYP1A1-Menge durch verschiedene Konzentrationen von BAP (Benzo(a)pyren), MC (Methylcholanthren) und BNF ( $\beta$ -Naphthoflavon). Gezeigt werden die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Leberzellisolationen (Isolation 3 und 4) der Regenbogenforelle. Alle Messungen wurden mit Zellhomogenat (10000 g Überstand) bzw. mit der Mikrosomenfraktion (ELISA) durchgeführt. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (n=3).

### 5.3.2 Berechnung und Auswertung von maximal induzierbarer CYP1A1-Menge und $EC_{50}$ -Werten

Zwischen den einzelnen Isolationen wurden sehr starke Unterschiede beobachtet. So lag die maximale (berechnete) EROD-Aktivität für Methylcholanthren im Bereich von 0,35 bis 2 nmol/min/mg Protein. Ähnliche Schwankungen ergaben sich auch für ECOD-Aktivität und CYP1A1 ELISA. Auch die Kurvenverläufe divergierten zum Teil sehr stark zwischen den einzelnen Isolationen (Abb. 5.3 und 5.4). Dies war insbesondere beim immunologischen Nachweis des CYP1A1 im ELISA zu beobachten. Einheitlich (Ausnahme CYP1A1-ELISA, Isolation 4) verhielt sich dagegen die Rangfolge bezüglich der maximalen induzierbaren Aktivität. Mit MC wurden immer die höchsten Aktivitäten bzw. Mengen von EROD, ECOD und in drei von vier Versuchen auch von CYP1A1-Protein erzielt. Der zweitstärkste Induktor bezüglich der maximalen Aktivitäten bzw. Proteinmenge war BAP. Die geringste Induktion wurde mit BAT und BNF notiert.

Aufgrund der hohen Schwankungen zwischen einzelnen Isolierungen wäre eine Mittelwertbildung und der Vergleich von Absolutwerten mit statistischer Sicherheit nicht möglich gewesen. Ein ähnlicher Sachverhalt ergab sich für die Ermittlung von  $EC_{50}$ -Werten: Wie bereits schon aus den stark unterschiedlichen Kurvenverläufen in den Abb. 5.3 und 5.4 ersichtlich war, wurden hier sehr große Schwankungen zwischen einzelnen Isolationen und den verschiedenen Nachweissystemen beobachtet. Da der Trend und die relativen Änderungen bei den einzelnen Isolationen aber vergleichbar waren, wurden Relativwerte im Gegensatz zu Absolutwerten für die Auswertung herangezogen wurden. Dabei wurden für die Bestimmung der maximalen induzierbaren Aktivität bzw. Proteinmenge und der Bestimmung von  $EC_{50}$ -Werten (d.h. die Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen induzierbaren Aktivität erreicht wurde) zwei unterschiedliche Verfahren gewählt:

#### 1. Berechnung der maximal induzierbaren Aktivität und CYP1A1-Proteinmenge:

- Bestimmung der maximal induzierbaren Aktivität bzw. Proteinmenge für jede Zellisolation (mit Hilfe der Approximation an eine sigmoide Kurve, Werte in nmol/min/mg Protein bzw. ng/10  $\mu$ g Protein).
- Umrechnung in Prozent der maximal mit MC mit dieser Zellisolation erzielten Aktivität bzw. CYP1A1 Proteinmenge.
- Mittelwertbildung aus diesen Prozentwerten (Abb. 5.8).

#### 2. Berechnung von $EC_{50}$ -Werten:

- Wie unter 1. Bestimmung der maximal induzierbaren Aktivität bzw. Proteinmenge für jede Zellisolation (mit Hilfe der Approximation an eine sigmoide Kurve, Werte in nmol/min/mg Protein bzw. ng/10  $\mu$ g Protein).
- Umrechnung in Prozent der maximalen Aktivität bzw. CYP1A1 Proteinmenge. Im Gegensatz zur Methode unter 1. wurden die Prozentwerte nicht auf die maximal mit MC induzierbare Aktivität sondern auf die maximale (berechnete) Aktivität der jeweiligen Substanz bezogen.
- Mittelwertbildung für jede Substanz. Es wurden die in Abb. 5.5 bis 5.7 abgebildeten Kurven erhalten. Die Kurven wurden neu aus den Prozentwerten errechnet (daher muß die maximal induzierbare Aktivität nicht unbedingt 100 % betragen!).
- Ermittlung der  $EC_{50}$ -Werte (siehe Kapitel 2).

Wie die Abbildungen 5.5 bis 5.7 zeigten, war eine Approximation durch eine sigmoide Kurve nach der Bildung der Mittelwerte aus verschiedenen Isolationen möglich, wenn diese auf der Basis von Prozentwerten berechnet wurden. Insbesondere für ECOD und den immunologischen Nachweis wurden aber dennoch relativ große Streuungen ermittelt.

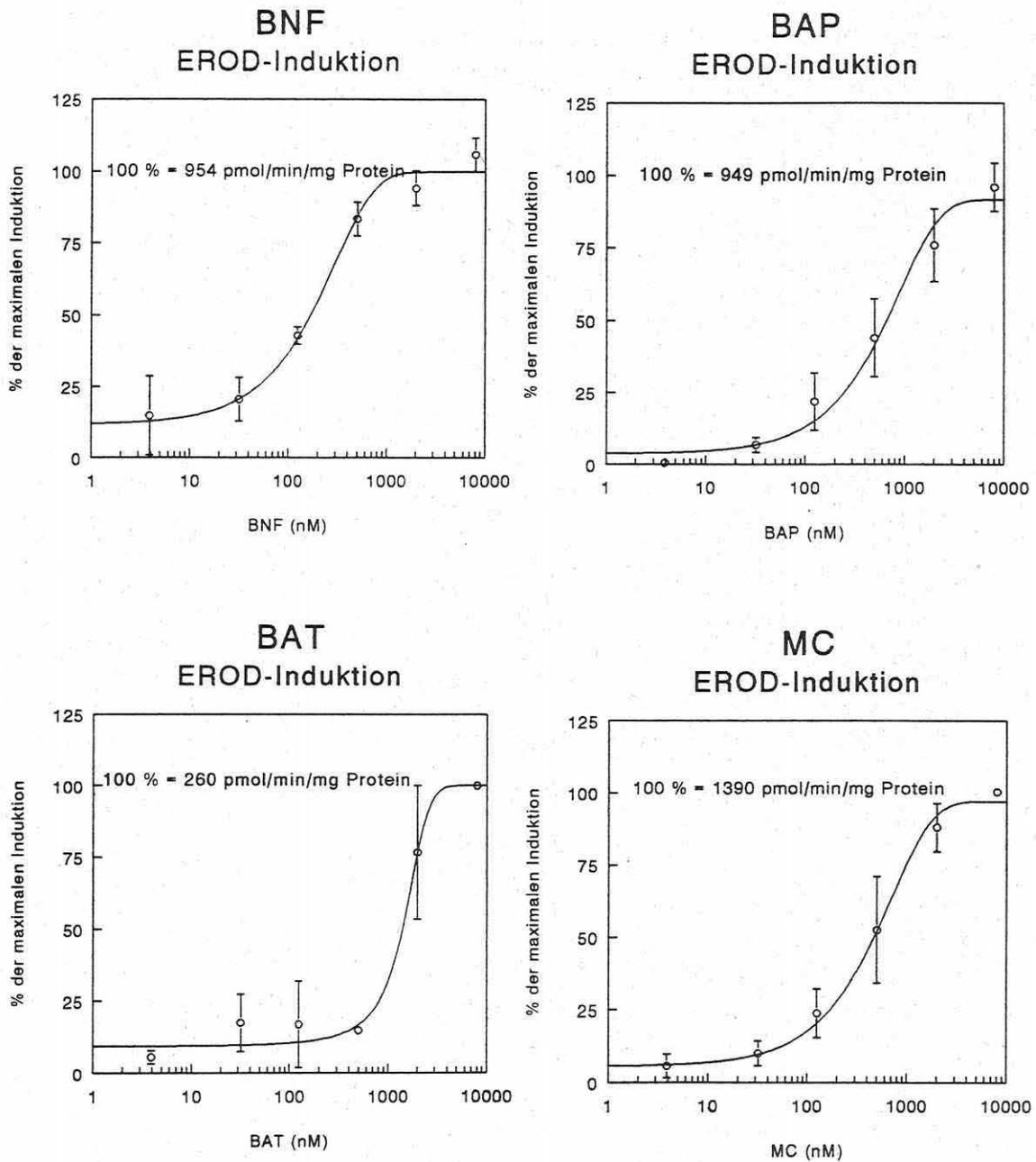


Abb. 5.5: EROD-Induktion in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen. EROD wurde nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Naphthoflavin (BNF), Benzo(a)pyren (BAP), Benz(a)anthracen (BAT) und Methylcholanthren (MC) im Zellhomogenat bestimmt und als Prozent der maximal (berechneten) induzierbaren Aktivität dargestellt. Die Meßwerte repräsentieren Mittelwerte aus 2 (BNF, BAT) bzw. 4 (BAP, MC) Zellsolationen  $\pm$  Standardfehler. Zur näheren Erläuterung der Berechnung siehe Ergebnisteil dieses Kapitels.

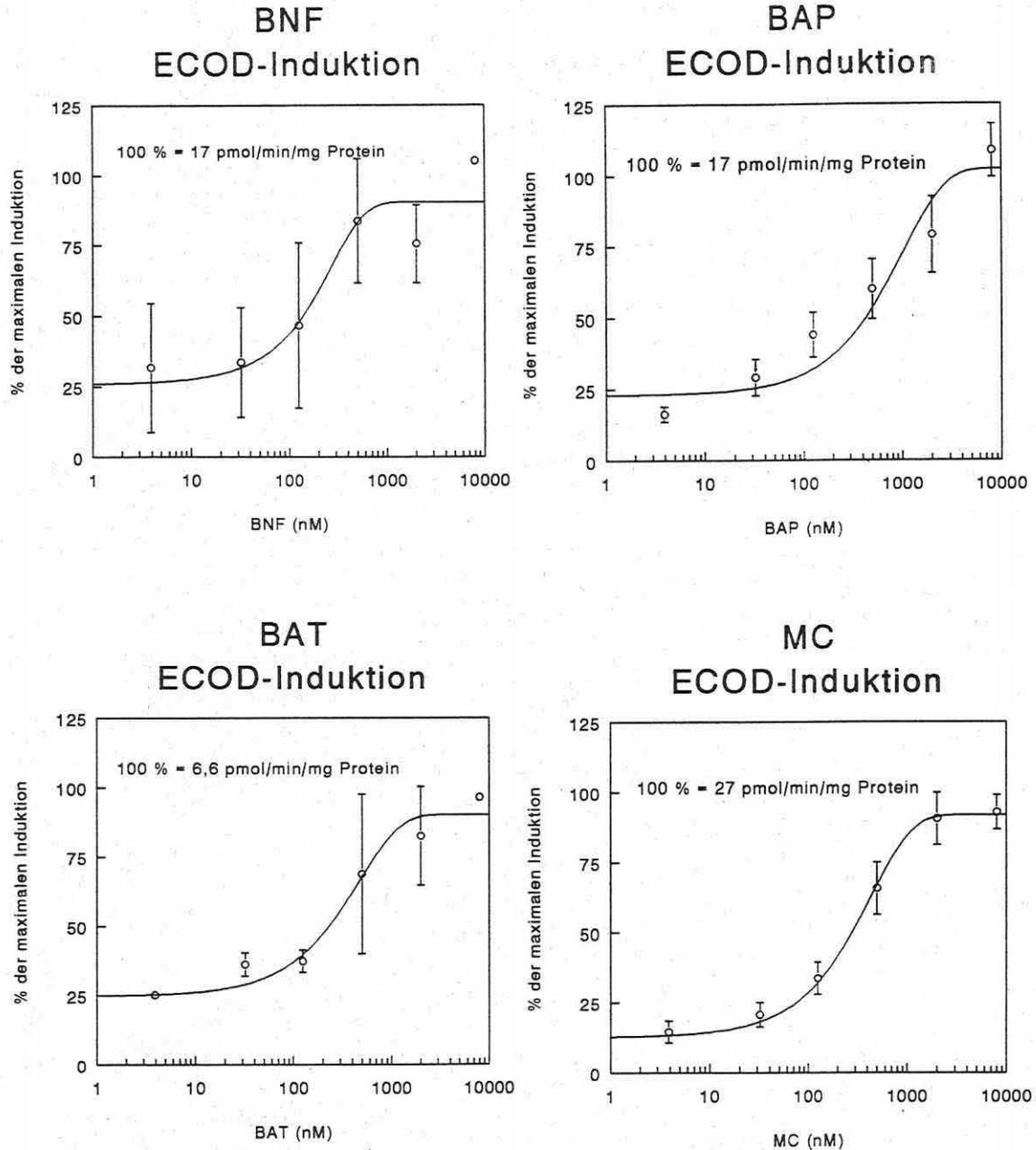


Abb. 5.6: ECOD-Induktion in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen. ECOD wurde nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF), Benzo(a)pyren (BAP), Benz(a)anthracen (BAT) und Methyicholanthren (MC) im Zellhomogenat bestimmt und als Prozent der maximal (berechneten) induzierbaren Aktivität dargestellt. Die Meßwerte repräsentieren Mittelwerte aus 2 (BNF, BAT) bzw. 4 (BAP, MC) Zellisolationen  $\pm$  Standardfehler. Zur näheren Erläuterung der Berechnung siehe Ergebnisteil dieses Kapitels.

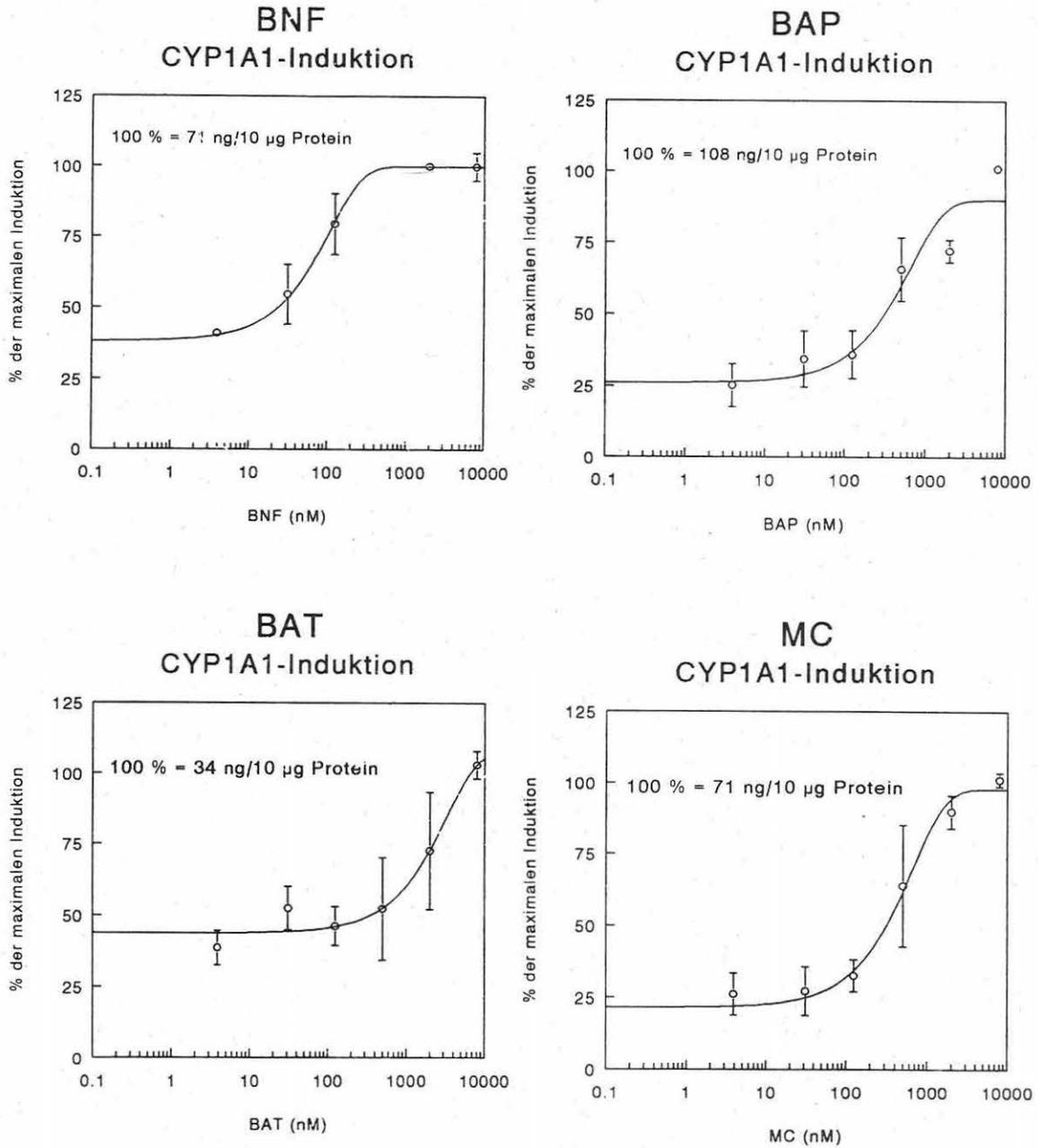
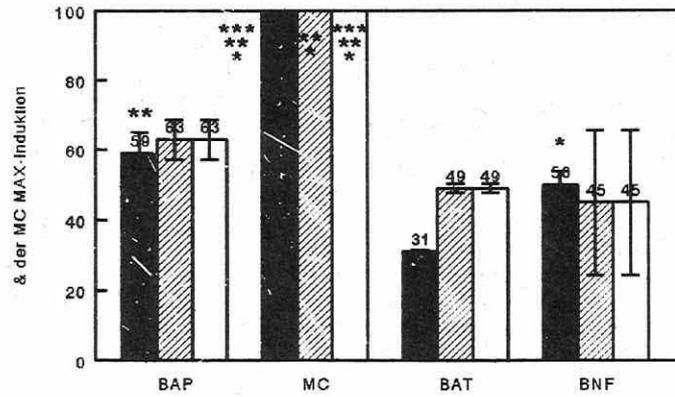


Abb. 5.7: CYP1A1-Induktion in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen. Die CYP1A1-Menge wurde durch einen ELISA nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF), Benzo(a)pyren (BAP), Benz(a)anthracen (BAT) und Methylcholanthren (MC) in der Mikrosomenfraktion bestimmt und als Prozent der maximal (berechneten) induzierbaren Aktivität dargestellt. Die Meßwerte repräsentieren Mittelwerte aus 2 (BNF, BAT) bzw. 4 (BAP, MC) Zellsolationen  $\pm$  Standardfehler. Zur näheren Erläuterung der Berechnung siehe Ergebnisteil dieses Kapitels.

### Induktion in Forellenleberzellen Maximale Induktionswerte



### EC-50-Werte

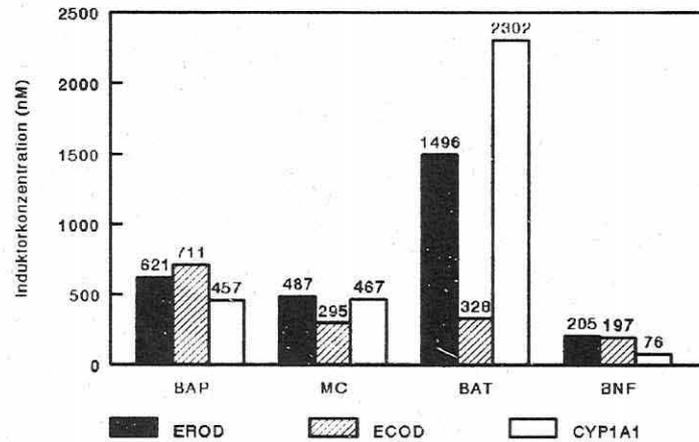


Abb. 5.8: Maximal induzierbare Aktivität bzw. Proteinmenge von EROD, ECOD und CYP1A1 und EC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Induktoren in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen. Die Zellkulturen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF), Benzoa-pyren (BAP), Benz(a)anthracen (BAT) und Methylcholanthren (MC) inkubiert. Die Messungen wurden im Zellhomogenat durchgeführt und basierten auf 2 (BAT, BNF) bzw. 4 (MC, BAP) Zellisolationen. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem t-Test, basierend auf einem 95 %igen Vertrauensbereich durchgeführt.

\* signifikant verschieden zum nächst niedrigeren Wert der jeweiligen Nachweismethode

\*\* signifikant verschieden zum zweit niedrigeren Wert der jeweiligen Nachweismethode

\*\*\* signifikant verschieden zum niedrigsten Wert der jeweiligen Nachweismethode

## 5. Induktion von CYP1A1

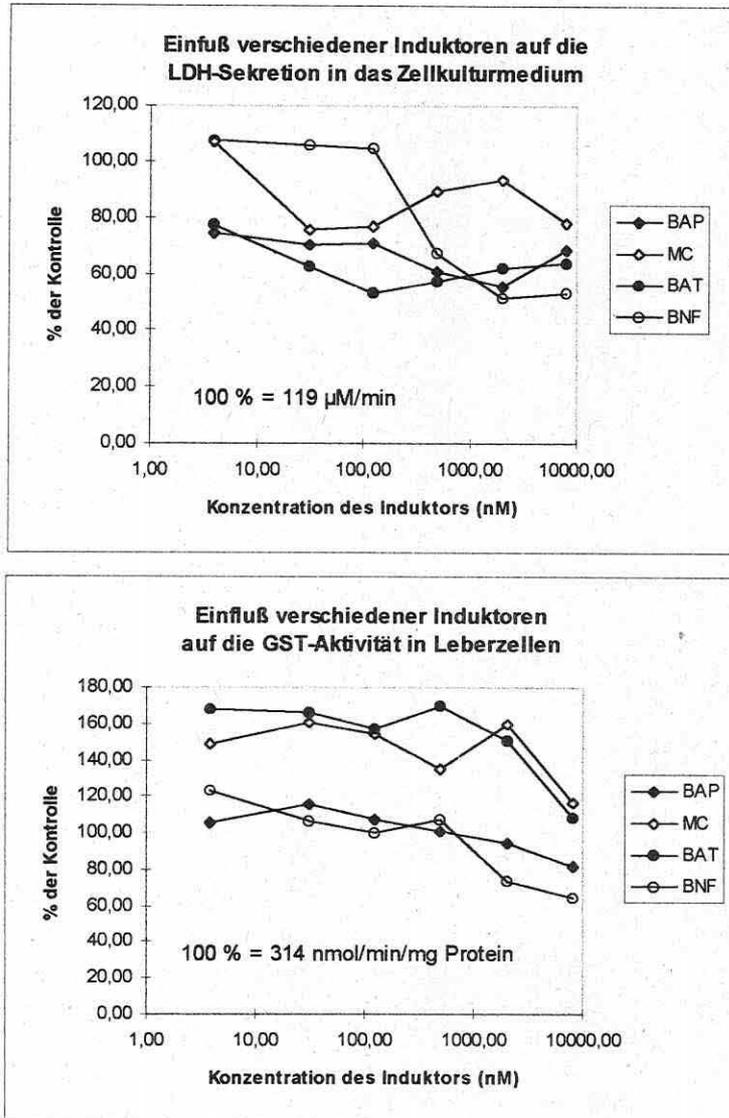


Abb. 5.9: LDH Sekretion in das Zellkulturmedium und GST-Hemmung bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Benzo(a)pyren (BAP), Methylcholanthren (MC), Benz(a)anthracen (BP) und  $\beta$ -Naphthoflavin (BNF) für 48 h. LDH wurde im Zellkulturmedium und GST im Zellhomogenat (10000 g Überstand) gemessen. Im Diagramm sind Mittelwerte, basierend auf 2 (BAT, BNF) bzw. 4 (MC, BAP) Zellisolationen, dargestellt.

Mit allen Nachweissystemen wurden für die einzelnen Substanzen sehr ähnliche Kurvenverläufe ermittelt. Eine Ausnahme hiervon bildet nur die Induktion von ECOD durch BAT (Abb. 5.6). Diese Übereinstimmung zwischen den einzelnen Nachweissystemen schlägt sich auch bei der Auswertung der auf Prozent- und Mittelwertbasis berechneten maximal induzierbaren Aktivitäten und EC50-Werten nieder. Mit allen Nachweissystemen wurde MC als Induk-

tor mit den höchsten induzierbaren Aktivitäten ermittelt. Als Induktor mit der zweithöchsten Kapazität wiesen alle Nachweissysteme BAP aus. Bezüglich BNF und BAT ergaben sich Unterschiede zwischen EROD und ECOD/CYP1A1-Protein. Ein signifikanter Unterschied auf Basis eines 95 %igen Vertrauensbereiches war jedoch nur mit Hilfe der EROD-Aktivität möglich, die BNF eine höhere maximale Induktion als BAT zuordnete. Signifikante Unterschiede auf Basis eines 95 %igen Vertrauensbereiches (t-Test, Student-Verteilung) konnten darüber hinaus für alle Nachweissysteme zwischen MC und BAP/BAT/BNF ermittelt werden.

Eine Signifikanzanalyse war für die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte nicht möglich, da sie bereits auf der Basis der gemittelten Kurven berechnet wurden. Doch auch hier zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse zwischen den verschiedenen Nachweissystemen. Alle Systeme wiesen BNF den geringsten  $EC_{50}$ -Wert zu. In der weiteren Rangfolge wiesen der CYP1A1-ELISA und die EROD-Aktivität MC, BAP und BAT die nächst höheren  $EC_{50}$ -Werte zu, wobei für BAT relativ hohe Werte ( $\approx 1500$  bis  $2300$  nM) im Vergleich zu BNF ( $\approx 80$  bis  $210$  nM) errechnet wurden. Eine Abweichung ergab sich bei der Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte mit Hilfe der ECOD-Aktivitäten. Hier wurde im Vergleich zu EROD und CYP1A1-ELISA ein sehr geringer  $EC_{50}$ -Wert ( $328$  nM) für BAT ermittelt, so daß sich eine abweichende Rangfolge für die  $EC_{50}$ -Werte ergab (Für eine zusammenfassende Darstellung der ermittelten Rangfolgen siehe auch Diskussionsabschnitt).

### 5.3.3 Einfluß auf die Zytotoxizität und die GST-Aktivität

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen maximalen CYP1A1-Mengen bei hohen Konzentrationen der verschiedenen Induktoren (ab ca.  $2 - 8 \mu\text{M}$ ) nicht eine Folge der zytotoxischen Wirkung der Induktoren war, wurde in allen Zellkulturüberständen die LDH-Aktivität gemessen. Geschädigte Zellen geben eine erhöhte Menge LDH ab, so daß man im Zellkulturmedium eine gesteigerte LDH-Aktivität messen kann (Begue et al., 1984; Miller et al., 1993b). Bei der Applikation von verschiedenen Induktoren bis zu einer Konzentration von  $8 \mu\text{M}$  konnte mit Hilfe der LDH-Aktivität keine verringerte Vitalität bzw. erhöhte Zytotoxizität festgestellt werden. Im Gegenteil wiesen alle Substanzen eine leicht (MC) bis stark (BNF) verringerte LDH-Sekretion auf (Abb. 5.9.).

Eine Hemmung der GST-Aktivität konnte mit zunehmenden Konzentrationen bei allen Substanzen beobachtet werden (Abb. 5.9.). Die stark erhöhte Konzentration gegenüber der Kontrolle (insb. bei BAP) ist möglicherweise auf einen methodischen Fehler (z.B. Verdünnungsfehler bei der Messung der Kontrolle) bei der Bestimmung der GST-Aktivität im Homogenat der Kontrollzellen zurückzuführen. Die beobachtete verringerte Aktivität war aber statistisch nicht signifikant.

Beide Messungen (LDH im Zellkulturmedium und GST im Homogenat 23) ergaben bei der Mittelwertbildung aus den einzelnen Isolationen sehr große Standardabweichungen ( $\sigma$  LDH 19 %, GST 23 %), die zu Gunsten einer übersichtlichen Darstellung in der Graphik nicht dargestellt wurden.

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Charakterisierung polyaromatischer Hydrokarbone durch CYP1A1-Induktion

Die Charakterisierung von organischen Umweltchemikalien hinsichtlich ihrer Induktionskapazität für Cytochrom P4501A1 (CYP1A1) kann von großer Bedeutung für die Abschätzung ihres Risikopotentials und Verbleibs in der Umwelt sein. Während für Säuger *in vivo*- und *in vitro*-Modelle für die Induktion von CYP1A1 häufig angewendet wurden und für die Untersuchung des Einflusses auf die Toxizität und die Erstellung von Struktur-Wirkungsbeziehun-

## 5. Induktion von CYP1A1

gen herangezogen wurden (Hansch & Zhang, 1993), sind insbesondere *in vitro*-Versuche mit Leberzellkulturen von Fischen nur vereinzelt beschrieben worden. In der Regel wurde in diesen Versuchen nur die Kapazität der Leberzellen, auf bestimmte PAHs (BNF oder BAP) mit der Induktion von CYP1A1 zu reagieren, dargestellt (Masfaraud et al., 1992a, b; Vaillant et al., 1989). Keine Untersuchungen zur Aufstellung von Dosis-Wirkungs- oder Struktur-Wirkungsbeziehungen sind bisher veröffentlicht worden. Daher wurden in diesem Kapitel modellhaft Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für vier verschiedene, als klassische CYP1A1-Induktoren beschriebene polyaromatische Hydrokarbone (Methylcholanthren, Benzo(a)pyren, Benz(a)anthracen und  $\beta$ -Naphthoflavon) aufgestellt und die  $EC_{50}$ -Werte und relativen maximalen induzierbaren Aktivitäten bzw. CYP1A1-Mengen berechnet.

$EC_{50}$ -Werte und maximale Induktion können wichtige Hinweise für das Verhalten einer Chemikalie in aquatischen Ökosystemen und ihr mögliches Risiko geben. Dabei sind die Auswirkungen von hohen oder niedrigen  $EC_{50}$ -Werten und schwacher oder starker Induktionskapazität jeweils genau umgekehrt, je nachdem ob die Metabolisierung durch CYP1A1 in eine Aktivierung oder in eine Deaktivierung der CYP1A1-Substrate mündet.

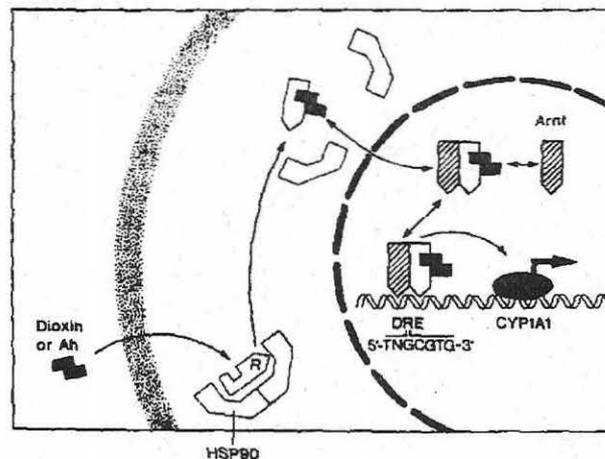


Abb. 5.10: Induktionsmechanismus von CYP1A1 (aus Bock (1993)). Ah = Arylhydrokarbon, HSP = Hitzeschockprotein, Arnt = Ah-Rezeptor-Kern-Translokator.

Ein niedriger  $EC_{50}$ -Wert bedeutet dabei auf eine hohe Affinität des Ah-Rezeptors zur betreffenden Substanz. Auf die Bindung des Substrats an den Ah-Rezeptor folgt die Abspaltung der hsp 90-Hitzeschockproteine vom Rezeptor und die Translokation in den Zellkern. Dieser Schritt wird ebenfalls durch ein Protein vermittelt, dem sogenannten Arnt-Protein („Aryl hydrocarbon nuclear translocator“). Der Arnt/Ah-Rezeptor/Substrat-Komplex bindet dann an einen Promotor (auch als XRE=xenobiotic responsiv element bezeichnet), welcher die Transkription des CYP1A1 reguliert.

Einer der wichtigsten Schritte bei der Regulation der CYP1A1-Transkription ist dabei die Bindung des Induktors an den Ah-Rezeptor. Zur Substanzklasse mit der höchsten Affinität zum Ah-Rezeptor und den stärksten Induktionsantworten gehören die Dioxine. Dies führte zur Postulierung der Bindungsstelle des Ah-Rezeptors für chlorierte Polyaromaten mit einer Größe von  $6,8 \times 13,7 \text{ \AA}$ , die mit höchster Affinität Dioxine mit Chloratomen an den Positionen 2, 3, 7 und 8 bindet. Als wichtige Strukturvoraussetzung für die Bindung eines

Moleküls an den Ah-Rezeptor Planarität bzw. die Ausbildung einer planaren Konformation bei der Bindung angenommen (Poland & Knutson, 1982; Rannug et al., 1991).

Die Toxizität der Dioxine bzw. der halogenierten polyaromatischen Kohlenwasserstoffe ist direkt korreliert mit ihrer Bindungskapazität für den Ah-Rezeptor. Als zu Grunde liegender Mechanismus wird dabei die zusätzliche Anschaltung der Transkription bestimmter Gene durch den Rezeptor/Dioxin-Komplex vermutet (Poland & Knutson, 1982). Für nicht chlorierte PAHs kann die Toxizität dagegen auch davon abhängen, ob die Metabolisierungsprodukte des CYP1A1 eine erhöhte (Aktivierung) oder geringere (Detoxifizierung) Toxizität aufweisen (Beresford, 1993; Goldstein & Faletto, 1993; Ingelman-Sundberg, 1980; Parke, 1987). Durch CYP1A1 aktivierte Chemikalien wären problematisch, wenn sie geringe  $EC_{50}$ -Werte und eine hohe Induktion hervorrufen würden, weil dies zu einer raschen Zunahme toxischer Metabolite führen könnte. Für Substanzen, die durch den Metabolismus über CYP1A1 detoxifiziert werden, wären diese Eigenschaften aber gerade von Vorteil, weil mit einer hohen Metabolisierungsrate und einer verringerten Bioakkumulation gerechnet werden müßte.

Die in diesem Kapitel exemplarisch durchgeführten Induktionsstudien mit BAP, BAT, BNF und MC sollten zeigen, wie ein Primärkultursystem von Forellenhepatozyten eingesetzt werden kann, um die CYP1A1-Induktionskapazität einer Substanz zu quantifizieren, um daraus ggf. später Schlußfolgerungen für eine Risikobeurteilung abzuleiten.

Aus den in diesem Kapitel ermittelten Werten konnte bezüglich der Induktion und der  $EC_{50}$ -Werte folgende Rangordnung aufgestellt werden:

1. maximale Induktion:                   MC>BAP>BNF≥BAT  
(alle Nachweissysteme)

2.  $EC_{50}$ -Werte:  
a) EROD:                               BAT>BAP>MC>BNF  
b) CYP1A1 ELISA:                   BAT~BAP≈MC>BNF  
c) ECOD:                               BAP>BAT>MC>BNF

Die Ermittlung der Rangfolge für die  $EC_{50}$ -Werte und maximale CYP1A1-Induktion basierte auf prozentualen Induktionswerten. Bei den absoluten Werten ergaben sich so hohe Abweichungen, daß eine Auswertung nicht möglich war. Durch die Umrechnung in Prozentwerte dagegen war der Nachweis eines signifikanten Unterschiedes möglich (Abb. 5.8). Dabei konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Nachweissystemen festgestellt werden. Während die Messung der EROD-Aktivität und die Bestimmung von CYP1A1 durch ELISA für BAT den höchsten  $EC_{50}$ -Wert auswies, erhielt man durch Messung der ECOD-Aktivität für BAP den höchsten  $EC_{50}$ -Wert. Eine mögliche Ursache könnte hier in der unterschiedlichen Isoenzympezifität von 7-Ethoxyresorufin (Substrat für EROD) und 7-Ethoxycoumarin (Substrat für ECOD) liegen. Wie in Kapitel 3 bereits erwähnt, wo die Lokalisation von ECOD im 20000 g Pellet demonstriert wurde, werden durch ECOD möglicherweise auch noch andere Isoenzyme des Cytochroms P450 erfaßt, so daß es zu veränderten  $EC_{50}$ -Werten kommen könnte. Diese verschiedene Isoenzympezifität zeigen auch die unterschiedlich induzierten Enzymaktivitäten, die mit EROD und ECOD bei der Applikation von Phenobarbital, Methylcholanthren und verschiedenen chlorierten Biphenylen bei Ratten gemessen wurden (Franklin et al., 1980; Kleinow et al., 1990). Auch zwischen EROD und CYP1A1-ELISA konnten Unterschiede festgestellt werden. Während mit EROD für BAP ein wesentlich höherer  $EC_{50}$ -Wert zugeordnet wurde als für

## 5. Induktion von CYP1A1

MC, zeigten im CYP1A1 ELISA beide Substanzen einen nahezu gleichen  $EC_{50}$ -Wert (BAP=457 nM, MC=467 nM). Ob diese Werte tatsächliche Unterschiede darstellen oder ob dies durch die hohen Schwankungen im CYP1A1-ELISA hervorgerufen wurde, kann nur durch Erhöhung des Stichprobenumfangs überprüft werden. Die hier erhobenen Daten basierten zum Teil nur auf zwei Zellisolationen. Die gezeigten Schwankungen zwischen den einzelnen Zellisolationen verdeutlichen aber, daß für eine genauere Bestimmung eine höhere Anzahl von Zellisolationen notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit, die Genauigkeit des ELISAs zu erhöhen, könnte u.U. mit einer Verlängerung der Inkubationsdauer erreicht werden. Wie im Kapitel 3 gezeigt wurde, konnte nach 4 Tagen eine wesentlich stärkere Induktion als nach 2 Tagen Inkubation erreicht werden.

Zwischen den maximalen Induktionsantworten und den  $EC_{50}$ -Werten konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen beiden Parametern ist aufgrund der Kenntnis des Induktionsmechanismus über die Bindung an den Ah-Rezeptor auch nicht zu erwarten. Bei entsprechend hohen Konzentrationen sollten theoretisch alle Ah-Rezeptor-Bindungsstellen abgesättigt sein und alle CYP1A1 Induktoren müßten die gleiche maximale Induktion hervorrufen. Die Affinität an den Ah-Rezeptor entscheidet nur, bei welcher Konzentration die Sättigung und damit die maximale Induktion erreicht wird. Unterschiede könnten nur durch eine sterische Behinderung der mRNA-Polymerase, Inhibition der katalytischen Aktivität von CYP1A1 oder durch toxische Wirkungen hervorgerufen werden. Auf eine mögliche toxische Ursache für die unterschiedlichen maximalen Induktionsantworten deutete die in einigen Zellisolationen beobachtete Hemmung von EROD-, ECOD-Aktivität oder CYP1A1-Menge bei hohen Induktorkonzentrationen hin (Abb., Isolation 1: BAT bei 8  $\mu$ M; Abb. 2, Isolation 3: MC, BAP und BNF). Auf der anderen Seite konnte aber mit Hilfe der Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium kein toxischer Einfluß der applizierten Substanzen nachgewiesen werden (Abb. 5.9). Hier sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. die Überprüfung genereller Stoffwechselleistungen wie der Proteinsynthese, um den Einfluß toxischer Wirkungen als Ursache für die unterschiedlichen maximalen Induktionsantworten zu überprüfen. Ein inhibierender Einfluß der applizierten Induktoren auf die katalytische Aktivität von CYP1A1 kann auch ausgeschlossen werden, da mit Hilfe des immunochemischen Nachweises von CYP1A1 im ELISA ebenfalls verschiedene maximale Induktionskapazitäten von MC, BAP, BAT und BNF festgestellt wurden.

Prinzipiell wäre auch denkbar, daß die hier gemessenen unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte und maximalen Induktionen für BNF, MC, BAT und BAP das Ergebnis einer unterschiedlich schnellen Aufnahme der Substanzen über die Zellmembran bzw. einer unterschiedlichen Akkumulation mit der Folge verschiedener intrazellulärer Konzentrationen sind. Die Aufnahme von Stoffen über die Zellmembran wird durch ihre Lipophilie bedingt (sofern keine sterischen Behinderungen auftreten), wobei Stoffe mit höherer Lipophilie die Zellmembran schneller passieren können (Spacie & Hamelink, 1984). Neben der Geschwindigkeit der Aufnahme über die Zellmembran kann die Lipophilie auch die zelluläre Bioakkumulation beeinflussen. Betrachtet man die Hepatozyten und das umgebende Kulturmedium als ein Zwei-Kompartimente-System, so würde ein Kompartiment durch die biologische Zelle, das andere Kompartiment durch das umgebende Medium repräsentiert (Streit, 1992). Die biologische Zelle (hier die Forellenleberzelle) besitzt im Gegensatz zum umgebenden wäßrigen Medium durch seine Lipidmembranen und Proteine eine Vielzahl von hydrophoben Komponenten. Unabhängig von der Geschwindigkeit der Aufnahme kann man daher eine verstärkte Bioakkumulation von lipophilen Substanzen in der Zelle erwarten.

Eine Maßzahl für die Lipophilie eines Stoffes ist der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient. Für die hier untersuchten Substanzen wurden von Hansch & Zhang (1993) folgende Octanol-Wasser-Verteilungs-Koeffizienten publiziert (dargestellt als  $\log K_{ow} = \log P$ ):

MC: 6,42  
 BAP: 5,97  
 BNF: 4,65 (berechnet)  
 BAT: nicht bestimmt

Quelle: Hansch & Zhang (1993)

Vergleicht man die  $\log K_{ow}$ -Werte von MC, BAP und BNF mit den hier ermittelten  $EC_{50}$ -Werten so kann man feststellen, daß keine Korrelation zwischen der Rangfolge beider Größen besteht, so daß die Geschwindigkeit bei der Aufnahme in die Zelle für die hier untersuchten Substanzen nicht die Ursache für die unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte sein kann.

Die Ausprägung einer Sättigungskurve im Löslichkeitsbereich der überprüften Induktoren deutet darauf hin, daß bereits genügend Moleküle zur Absättigung der Ah-Rezeptor-Bindungsstellen in die Zelle gelangt sein müssen, so daß auch eine unterschiedliche intrazelluläre Akkumulation nicht die Ursache für die unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte und maximalen Induktionen sein kann.

Eine genaue Klärung der Frage, inwieweit kinetische Faktoren an der Ausbildung von  $EC_{50}$ -Werten und maximaler Induktion beteiligt sind, kann aber nur durch zusätzliche Messungen - die im Rahmen dieser Untersuchung nicht durchgeführt werden konnten - wie die Bestimmung von  $EC_{50}$ -Werten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Induktor und durch Messung der intrazellulären Induktorkonzentration, erreicht werden.

Ein Vergleich mit bisher bei Säugern und Säugerzellkulturen erzielten Struktur-Wirkungs-Daten sollte überprüfen, ob Übereinstimmungen bzw. Unterschiede zwischen beiden Systemen (Fisch- und Säuger-CYP1A1-Induktion) bestehen und ob durch die Charakterisierung der Induktion von CYP1A1 in einem dieser beiden Systeme Spezies-übergreifende Aussagen zur Charakterisierung von PAHs gemacht werden können. Ein direkter Vergleich war aber nicht möglich, da Daten aus Säugersystemen entweder aus sehr heterogenen Quellen stammten oder weder  $EC_{50}$ -Werte noch relative Induktionswerte aufgestellt wurden.

Substanz	Ah-Rezeptor-Affinität	$EC_{50}$ (EROD) nM	$EC_{50}$ (CYP1A1-ELISA) nM	maximale Induktion (EROD) % von MC
TCDD	++++	-	-	-
MC	++++	487	467	100
BAP	+++ / ++	621	457	59
BAT	++	1496	2302	31
BNF	nicht bestimmt	205	76	50
	1	2	2	2

<sup>1</sup> Rannug et al. (1991), auf der Basis experimenteller Daten

<sup>2</sup> Primärzellkulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (aus dieser Arbeit)

Tab. 5.1: Ah-Rezeptor Affinität im Zytosol von Rattenleber und  $EC_{50}$ -Werte/maximale Induktion in Leberzellkulturen von Regenbogenforellen.

Dagegen stellen die von Rannug et al. (1991) publizierten Daten die umfangreichste Studie auf diesem Gebiet dar. Sie analysieren die Strukturkomponenten für die Bindung an den Ah-Rezeptor mit Hilfe eines Computeralgorithmus, dem sogenannten CASE-Programm (Computer Automated Structure Evaluation). Die verwendeten Daten basieren auf zwei unterschiedlichen Methoden der Bestimmung der Ah-Rezeptor-Affinität: Elektrofokussierung (Gillner et al., 1985) und Saccharose-Gradienten-Technik (Okey et al., 1979). Dabei wurden die Daten aus 13 verschiedenen Publikationen gesammelt und für die Bestimmung sogenannter Biophoren (aktive Struktureinheiten) und Biophoben (inaktivierende Struktureinheit) ausgewertet. Die Datensammlung umfaßt sowohl PAHs, nitro-PAHs, Heterozyklen, Dioxine, Furane und Biphenyle. Auf die mit dem CASE-Programm berechneten Werte soll hier nicht weiter eingegangen werden. Dafür wird die Affinität einiger dort beschriebenen Substanzen für den Ah-Rezeptor mit den in dieser Arbeit ermittelten  $EC_{50}$ -Werten und maximal induzierbaren Aktivitäten verglichen (Tab. 5.1). Leider sind keine Daten für  $\beta$ -Naphthoflavon erhoben worden, so daß diese Substanz nicht mit in die Vergleiche einbezogen werden kann. Als zusätzliche Vergleichssubstanz wurde noch TCDD aufgelistet. TCDD wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da die nötigen Sicherheitsanforderungen im Labor nicht gegeben waren.

Die mit der Ah-Rezeptor-Affinität ermittelten Daten zeigten die gleiche Rangordnung für MC, BAP und BAT wie die mit EROD ermittelten  $EC_{50}$ -Werte. Da sich das P450-System bezüglich seiner Induzierbarkeit durch PAH und der 1A1-Isoenzyme nicht grundsätzlich von dem der Säugetiere unterscheidet (Goksoyr & Förlin, 1992; Stegeman et al., 1990), repräsentieren die hier gefundenen  $EC_{50}$ -Werte für EROD offenbar die Affinitäten zum Ah-Rezeptor. Zwar wurden die Ah-Rezeptor-Affinitäten im Zytosol gemessen, während die EROD-Aktivität im Homogenat von Zellen bestimmt wurden, die im intakten Zustand mit den Induktoren inkubiert waren. Die applizierten Substanzen mußten also im Gegensatz zur Ah-Rezeptor-Affinitätsmessung erst die Zellmembran passieren, bevor eine Bindung an den Ah-Rezeptor erfolgen konnte. Da aber - wie in den vorausgegangenen Erläuterungen diskutiert wurde - die Aufnahme der Substanzen und ihre Bioakkumulation nicht die Ursache für die unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werte sein dürfte, kann offensichtlich die Rangfolgen der EROD- $EC_{50}$ -Werte aus Forellenhepatozyten direkt mit der Rangfolge der Ah-Rezeptor-Affinitäten im Leberzytosol von Ratten korreliert werden.

Von der Ah-Rezeptor-Affinität etwas abweichende Daten wurden mit den Meßsystemen ECOD und CYP1A1-ELISA ermittelt. Wie bereits weiter oben erläutert, sind diese aber möglicherweise auf die unterschiedliche Isoenzympezifität und/oder hohe Meßschwankungen bei geringer Anzahl von Zellisolationen zurückzuführen, so daß für den Vergleich mit der Ah-Rezeptor-Affinität nur die EROD-Daten herangezogen wurden.

Ein weiteres Enzym, für das eine Regulation durch den Ah-Rezeptor zumindest für bestimmte Isoenzyme beschrieben wurde, ist die GST (Bock, 1993). Für die GST konnte mit steigender Induktorkonzentration eine verringerte Aktivität beobachtet werden (Abb. 5.9). Aufgrund der hohen Standardabweichungen war eine statistisch signifikante Aussage aber nicht möglich. Für die Hemmung der GST käme sowohl eine toxische Ursache (verringerte Proteinsyntheseleistung) als auch ein spezifischer Hemmechanismus in Betracht. In der Literatur werden unterschiedliche Effekte durch PAHs auf die Aktivität der GST beschrieben (Stegeman et al., 1992). Je nach Spezies können gegenteilige Effekte auftreten. Während z.B. für Aal und Barbe eine Hemmung berichtet wird (Lemaire et al., 1992b; Lemaire-Gony & Lemaire, 1992), wurden bei anderen Spezies (Collier & Varanasi, 1991; James et al., 1988) keine signifikanten Änderungen beobachtet. Für die Regenbogenforelle (Andersson et al., 1985) konnte eine leichte Induktion der GST mit BAP gezeigt werden. Mit BNF wurde in dieser Arbeit (Kapitel 3, Abb. 3.1) ebenfalls eine

Induktion der GST im Homogenat der Leber von BNF-injizierten Fischen nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, konnten diese *in vivo*-Beobachtungen mit den Primärzellkulturen nicht bestätigt werden. Eine Ursache könnte möglicherweise ein geändertes GST-Isoenzymmuster in der Primärzellkultur sein. Da nur für ein Isoenzym die Regulation durch den Ah-Rezeptor nachgewiesen ist (Bock, 1993), mit dem Substrat CDNB aber alle Isoenzyme nachgewiesen werden (Stegeman et al., 1992), könnte durch eine Verschiebung des Expressionsmuster der GST-Isoenzyme der Nachweis der Induktion der Ah-Rezeptor-kontrollierten GST überlagert werden. Änderungen in der Expression verschiedener Enzyme in Primärzellkulturen sind sehr häufig beschrieben und konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden (siehe ausführliche Erläuterungen im Kapitel 3).

Ob der Rückgang der GST-Aktivität eventuell auf eine toxische Wirkung der Induktoren oder ihrer Metabolite zurückzuführen war, konnte mit Hilfe der hier durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden. Hierzu wären Messung z.B. zur Proteinsyntheseleistung der Primärzellen notwendig. Außerdem müssten weitere Toxizitätsparameter wie MTT- oder Kristallviolett-Test (Lenz et al., 1993) untersucht werden.

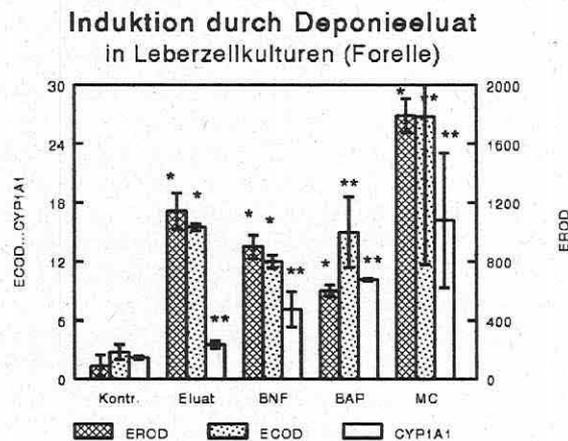


Abb. 5.11: Induktion von CYP1A1 durch wässrige Deponieeluate. Leberzellen aus Regenbogenforellen wurden für 48 h mit den Eluaten und verschiedenen Positivkontrollen (2 µM BNF, BAP und MC) inkubiert. Der Nachweis erfolgte entweder über die Enzymaktivitäten von EROD und ECOD (Werte in pmol/min/mg Protein) oder durch Detektion von CYP1A1 mit einem spezifischen Antikörper im ELISA (Werte in ng/10 µg Protein). Die Signifikanzanalyse wurde mit dem t-Test, basierend auf einem 95 %igen (\*) oder 80 %igen (\*\*) Vertrauensbereich durchgeführt. Die Markierung indiziert einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

#### 5.4.2 Induktion von CYP1A1 durch Deponieeluate

Außer den bisher diskutiertem Einsatz von Primärzellkulturen der Regenbogenforellenleber zur Aufstellung von Dosis bzw. Konzentrations-Wirkungskurven und zu Struktur-Wirkungsüberlegungen, wurde die Möglichkeit untersucht, dieses System (Induktion von Biotransformationsenzymen) zum Nachweis der Belastung von Gewässern mit aromatischen Kohlenwasserstoffen zu nutzen. Gegenüber analytischen Verfahren bietet diese Methode

## 5. Induktion von CYP1A1

den Vorteil, daß eine Belastung ohne genaue Kenntnis der Substanzen und als Summenparameter erfaßt werden kann. Aufwendige chemische Analysen entfallen. Durch die Induktion von CYP1A1 wäre außerdem ein Meßsystem gegeben, mit dem sich direkt eine biologische Wirkung aufzeigen ließe. Die mit immer niedrigeren Nachweisgrenzen arbeitende chemische Analytik kann aber die Frage nach der biologischen Relevanz einer gemessenen Konzentration nicht beantworten.

Es zeigte sich, daß auch mit Umweltproben, die durch organische Schadstoffe belastet waren, eine Induktion von CYP1A1 ausgelöst werden konnte. Untersucht wurden Eluate einer Halde im Mansfelder Revier, für die eine Belastung mit organischen Schadstoffen bekannt war. Das Haldenmaterial enthielt hohe Quarz- und Calcitanteile, sowie etwas Gips und bis zu 9 % Kohlenstoff und Bitumen (Auskunft Dr. A. Paschke, UFZ-Leipzig-Halle).

Die im Haldenmaterial nachgewiesenen polyaromatische Kohlenwasserstoffe waren natürlichen Ursprungs. Durch den Abbau von Kupferschiefermergel gelangten diese Kohlenwasserstoffe auf eine Abraumhalde. Durch die Verwendung des Abraummateri als Baumaterial bestand die Gefahr der Mobilisierung der PAHs. Um die potentielle Mobilisierung der organischen Schadstoffe aus dem Haldenmaterial zu überprüfen, wurden diese unter möglichst realistischen, den natürlichen Bedingungen angenäherten Verfahren extrahiert. Die Extraktion der Proben erfolgte daher nicht mit Lösungsmitteln, sondern mit destilliertem Wasser. Ein wäßriges Elutionsverfahren im neutralen bis sauren Bereich entspricht Bedingungen, wie sie auch natürlich vorkommen, z.B. durch Regen-, Sicker- oder Grundwasser. Im Gegensatz dazu stellen die manchmal angewandten Extraktionsverfahren mit Lösungsmitteln (Brunström et al., 1995; Lindström-Seppä et al., 1993) künstliche Bedingungen dar, die zu einer Konzentrierung bestimmter Substanzen führen. Die durch Lösungsmittelextraktion gewonnenen Ergebnisse können zwar zum Nachweis von toxischen oder CYP1A1-induzierenden Substanzen eingesetzt werden. Ob durch sie eine biologisch relevante Wirkung erzeugt wird, kann aber nicht erfaßt werden.

Die Eluate wurden ohne weitere Behandlung zu gleichen Teilen mit doppelt-konzentriertem Medium versetzt und nach 24 h, nachdem sich alle Zellen angeheftet hatten, mit den Zellen 48 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden außerdem je 2 µmolare Konzentrationen von MC, BAP und BNF untersucht. Die Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Zellisolationen durchgeführt, die in diesem Falle relativ geringe Abweichungen von einander zeigten, so daß die Mittelwerte aus den Absolutwerten und nicht den Prozentwerten berechnet wurden.

Die Abb. 5.11 zeigt, daß mit allen drei Nachweismethoden (enzymatisch mit EROD/ECOD und durch ELISA) eine Induktion durch das Deponieeluat nachgewiesen werden konnte. Für EROD und ECOD lag die Induktionsantwort dabei im Bereich der mit 2 µM BAP und BNF erzielten Werte. Abweichend verhielt sich dabei die Induktionsantwort von CYP1A1, wenn diese durch einen ELISA nachgewiesen wurde. Während für EROD und ECOD eine erhöhte Aktivität mit einer statistischen Sicherheit von 95 % (t-Test) beobachtet wurde, konnte eine Erhöhung mit dem ELISA nur mit 80 %iger Sicherheit nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die Induktionsantwort auch wesentlich geringer als die mit 2 µM BNF, BAP oder MC ermittelten Werte.

Auch wenn offensichtlich mit dem CYP1A1-ELISA eine geringere Sensitivität gegeben war, kann die Anwendung dieses Meßsystems dennoch aufgrund der bereits erwähnten Hemmung der EROD durch einige PAHs von Bedeutung sein. Beide Nachweissysteme in Kombination (EROD/ECOD und CYP1A1-ELISA) würden sich demnach gut eignen, um eine biologisch relevante Belastung mit PAHs nachzuweisen. Bei den vorliegenden Ergebnissen bestätigten die chemischen Analysen (siehe Abb. 5.12), daß die Induktion auf eine Kontamination der Eluate mit PAHs zurückzuführen war. Die polyaromatischen Kohlenwas-

serstoffe, unter Ihnen auch das hier in der Konzentrations-Wirkungsbeziehung getestete Benzo(a)pyren und Benz(a)anthracen konnten in Konzentrationen im Bereich von umgerechnet ca. 10 bis über 100 nM nachgewiesen werden (Tab. 5.2, .Analyse durchgeführt von Dr. Popp, UFZ Sektion Analytik), womit sie in dem Konzentrationsbereich lagen, der auch durch die Konzentrations-Wirkungskurven von BAP, MC, BNF und BAT abgedeckt wurde.

Phenanthren	25,5	Anthracen	2,6
Fluoroanthren	69,1	Pyren	43,7
Benzo(a)anthracen	19,0	Chrysen	35,3
Benzo(b)fluoranthren	36,4	Benzo(k)fluoranthren	16,3
Benzo(a)pyren	28,0	Indeno(1,2,3)pyren	30,4

Tab. 5.2: Gehalte der polyaromatischen Hydrokarbone des auf Induktion von CYP1A1 überprüften Deponieeluats in µg/l (Analyse durchgeführt von Dr. Popp, UFZ-Sektion Analytik).

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel haben gezeigt, daß sich Primärkulturen von Fischleberzellen für die Aufstellung von Konzentrations-Wirkungskurven eignen. Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte stimmten mit Literaturdaten zur Ah-Rezeptoraffinität überein. Neben der Charakterisierung des Risikopotentials von Chemikalien mit Hilfe ihrer CYP1A1-Induktionseigenschaften konnte auch die Belastung einer Umweltprobe mit organischen Substanzen durch CYP1A1-Induktion nachgewiesen werden.

## 6. Charakterisierung und Vergleich von Biotransformations- und charakteristischen Leberenzymen bei Karpfen und Regenbogenforelle

### 6.1 Zusammenfassung

Die pH-Wert- und Temperatur-Optima, sowie die kinetischen Konstanten von einigen Biotransformations- und Stoffwechsellenzymen des Karpfens und der Forelle wurden bestimmt. Relativ große Unterschiede konnten dabei für die pH-Wert-Optima der Phase 1-Biotransformationsenzyme NCR, EROD und ECOD beobachtet werden. Unterschiede bezüglich der zeitabhängigen Expression konnten insbesondere für die Biotransformationsenzyme GST (Glutathion-S-Transferase) und EROD (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase) in Primärkulturen von Leberzellen aus Forellen und Karpfen gefunden werden. Die möglichen Ursachen und Auswirkungen dieser Unterschiede werden diskutiert und mit Messungen aus anderen Untersuchungen verglichen.

### 6.2 Einleitung

Die Oxidation und Konjugation von polyaromatischen (chlorierten) Hydrokarbonen durch Biotransformationsenzyme hat entscheidenden Einfluß auf deren Toxizität und Bioakkumulation. Daher ist die kinetische Charakterisierung dieser Enzyme von großer Bedeutung, insbesondere dann, wenn die mit einer Spezies gewonnenen Ergebnisse auf andere Arten übertragen werden sollen bzw. wenn die Biotransformationskapazitäten verschiedener Arten miteinander verglichen werden sollen.

Zwischen einzelnen Vertretern der verschiedenen Wirbeltierklassen bestehen zum Teil große Unterschiede für die spezifischen Aktivitäten der Biotransformationsenzyme (Gregus et al., 1983). Innerhalb einer Wirbeltierklasse, so z.B. für die Fische, fehlt bisher ein umfassender Vergleich verschiedener Arten und ihrer Biotransformationskapazitäten. Doch deuten die bei einigen Spezies durchgeführten Untersuchungen darauf hin, daß keine großen Unterschiede bestehen und die Enzymaktivitäten sich in vergleichbaren Größenordnungsbereichen bewegen (Goksøyr et al., 1987; Monod et al., 1988; Vindimian & Garric, 1989). Während bezüglich der *in vitro*-Deaktivierung und Aktivierung von Organophosphaten große Speziesunterschiede bestehen (de Bruijn et al., 1993), konnten für die Metabolisierung von Chloranilinen und -benzolen selbst bei nicht näher verwandten Arten wie Salmoniden und Poeciliiden *in vitro* sehr ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden (de Wolf, 1992). Bei *in vivo*-Versuchen dürfte dagegen in der Regel mit einer höheren Varianz gerechnet werden, da hier neben der Metabolisierung noch weitere Faktoren wie Aufnahme der Stoffe über Kieme und Darm, Verteilung im Körper und Exkretion die Toxizität und Bioakkumulation beeinflussen.

Die Charakterisierung und der Vergleich von Enzymen aus verschiedenen Spezies ist von Bedeutung, wenn die gewonnenen Daten auf andere Spezies übertragen werden sollen. Sie können Hinweise geben, wo Versuche zusätzlich mit anderen Arten durchgeführt werden müssen. Die Charakterisierung der Enzyme beinhaltet zum einen die pH-Wert- und Temperaturoptima, zum anderen kinetische Parameter. Letztere ergeben sich aus der Michaelis-Menten-Gleichung (Suelter, 1985):

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dabei ist  $K_m$  eine charakteristische Enzymkonstante.  $K_m$  ist im Gegensatz zu  $V_{\max}$  unabhängig von der Enzymkonzentration. Sie stellt eine Bindungskonstante dar, wobei kleine  $K_m$ -Werte eine hohe Affinität des Substrates (d.h. bei relativ geringen Konzentrationen wird bereits die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht) bedeuten.  $V_{\max}$  und  $K_m$  beeinflussen beide die Reaktionsgeschwindigkeit. Ihre Bestimmung für die Biotransformationsenzyme kann daher Aufschluß über die mögliche Umsetzungskapazität von Xenobiotica ergeben.

In diesem Kapitel wurden die pH-Wert- und Temperaturoptima sowie die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  sowohl für einige Biotransformationsenzyme als auch für einige Stoffwechsellzyme bestimmt. Die unterschiedliche Entwicklung von Enzymaktivitäten in Leberzellkulturen von Karpfen und Forelle wurde gezeigt.

### 6.3 Ergebnisse

#### 6.3.1 pH-Optima

Die pH-Optima zweier für die Funktion der Leber wichtige Stoffwechsellzyme - PEP-CK und GPT - zeigten ihre höchste Aktivität im neutralen pH-Bereich (pH 7-7,5). Die Toleranz für saure pH-Werte war dabei etwas größer, während mit zunehmender Alkalität ein starkes Absinken der Aktivität beobachtet werden konnte. Unterschiede zwischen Forelle und Karpfen konnten nur dahingehend festgestellt werden, daß für die PEP-CK des Karpfens eine starker Aktivitätsabfall auch für sinkende pH-Werte gemessen wurde (Abb. 6.1).

Für GST lagen die höchsten Aktivitäten ebenfalls im neutralen Bereich (pH 7-8). Sowohl der Karpfen als auch die Forelle zeigten einen relativ starken Abfall der Enzymaktivitäten mit sinkendem oder steigendem pH-Wert (Abb. 6.2). Sehr auffällige Unterschiede zwischen Karpfen und Forelle konnten dagegen bei den Biotransformationsenzymen beobachtet werden. Während für die Forelle die Aktivitätsmaxima für NCR, EROD und ECOD eindeutig bei alkalischen pH-Werten zu finden waren (pH 8-9,5), konnte eine ausgeprägte Präferenz für alkalische Bedingungen beim Karpfen nicht beobachtet werden (NCR und ECOD). Vielmehr lag das Aktivitätsmaximum im leicht sauren pH-Bereich (pH 6,5) (Abb. 6.2).

Ganz besonders ausgeprägt waren die Unterschiede im pH-Optimum für das Enzym EROD. Sowohl die Forelle als auch der Karpfen wiesen eine ausgeprägte Abhängigkeit vom pH-Milieu auf. Karpfen-EROD hatte dabei eine maximale Aktivität bei pH 6,5, Forellen-EROD bei 8,5.

#### 6.3.2 In vitro-Temperaturoptima

Bezüglich ihrer Temperaturabhängigkeit wurden nur 4 Enzyme untersucht. Die beiden für den Leberstoffwechsel bedeutenden Enzyme PEP-CK und GPT und als Vertreter der Biotransformationsenzyme NCR und GST.

Für die Stoffwechsellzyme zeigte die Forelle ein klares Optimum bei einer Temperatur von 25°C. Für den Karpfen ließ sich ein schwach ausgeprägtes Optimum für die PEP-CK bei 30°C feststellen. Für GPT wurde ein stetiger Anstieg der Enzymaktivität nachgewiesen; innerhalb des gemessenen Temperaturbereichs konnte beim Karpfen kein Temperaturoptimum nachgewiesen werden. Die Biotransformationsenzyme NCR und GST verhielten sich dagegen bei Karpfen und Forelle annähernd gleich. Beide Enzyme hatten ein Temperaturoptimum bei 25°C (Abb. 6.3).

## 6. Vergleich von Karpfen und Forelle

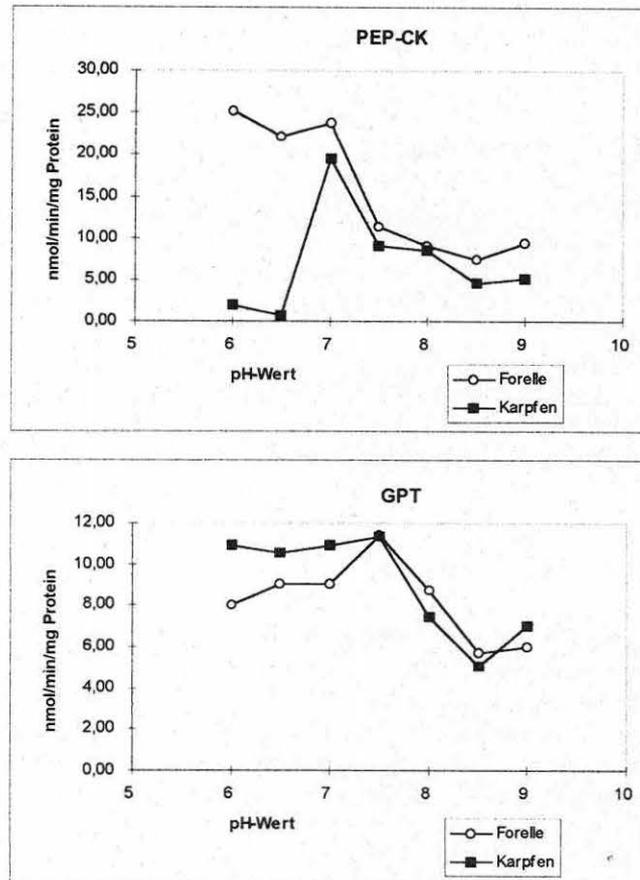


Abb. 6.1.: pH-Optimum von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Gemessen wurde im 10 000 g Überstand von Leberhomogenat unbehandelter Forellen und Karpfen.

Die van't Hoffsche Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel besagt, daß sich die bei einer Temperaturerhöhung von 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis vervierfacht (Penzlin, 1989). Sofern das Temperaturoptimum nicht überschritten wurde, konnte für alle Enzyme die van't Hoffsché Regel bestätigt werden. Für die GST muß hierzu eine Extrapolation vorgenommen werden, da unterhalb des Temperaturoptimums von 20°C nur ein weiterer Meßpunkt bei 15°C existiert. Für die PEP-CK des Karpfens konnten zur Überprüfung der van't Hoffschén Regel ebenfalls nur die Werte bei 25 und 30°C herangezogen werden, da bei niedrigeren Temperaturen nur sehr geringe Enzymaktivitäten meßbar waren. Da aber bereits in diesem 5°C Intervall eine Zunahme von ca. 3 auf 8 nmol/min/mg Protein erfolgt, so scheint auch hier ein  $Q_{10}$ -Wert zwischen 2 und 4 möglich.

### 6.3.3 Abhängigkeit der NCR von der KCN-Konzentration

KCN wurde dem Reaktionsansatz zur Unterdrückung nicht mikrosomaler NADPH Cytochrom-c (P450)-Reduktase zugesetzt. Wie die Ergebnisse zeigten, hatte KCN aber keinen hemmenden Einfluß auf die gemessene NCR Aktivität. Im Gegenteil konnte eine leicht erhöhte Aktivität mit KCN festgestellt werden (Abb. 6.4).

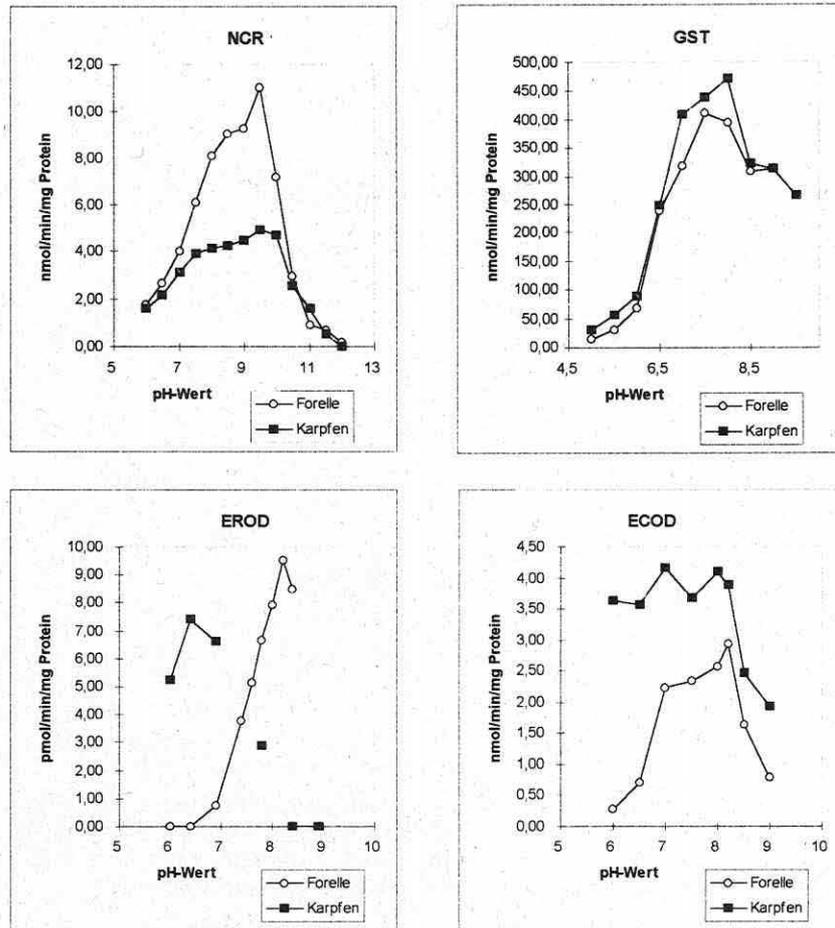


Abb. 6.2: pH-Optimum von NADPH-Cytochrom c (P450)-Reduktase (NCR), Glutathion-S-Transferase (GST), 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD). Gemessen wurde im 10 000 g Überstand von Leberhomogenat unbehandelter Forellen und Karpfen.

#### 6.3.4 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Bezüglich der Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden die Enzyme GPT, NCR, GST und UGT (UDP-Glucuronyltransferase, nur Mikrosomen von BNF-behandelte Forellen gemessen, Abb. 6.7) untersucht. Für alle Enzyme konnten typische, einer Michaelis-Menten-Kinetik entsprechenden Sättigungskurven ermittelt werden. Eine Darstellung im Lineweaver-Burk-Plot ergab eine lineare Abhängigkeit (Abb. 6.5 für Forelle und Abb. 6.5 für Karpfen). Die Transformation des Lineweaver-Burk-Plots wurde für die Kalkulation des  $k_m$ - und des  $V_{max}$ -Wertes herangezogen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6.1 zusammengefaßt dargestellt.

Die Charakterisierung der Enzyme GPT, NCR und GST mit Hilfe von  $k_m$ - und  $V_{max}$ -Werten (Tab. 6.1) ergab dabei keine großen Unterschiede zwischen dem Karpfen und der Forelle. Die gemessenen Werte lagen jeweils innerhalb einer Größenordnung. Die größte Differenz wurde bezüglich der Affinität der GPT für das Substrat  $\alpha$ -Ketoglutarat beobachtet, bei der der Karpfen einen kleineren  $k_m$ -Wert zeigte.

## 6. Vergleich von Karpfen und Forelle

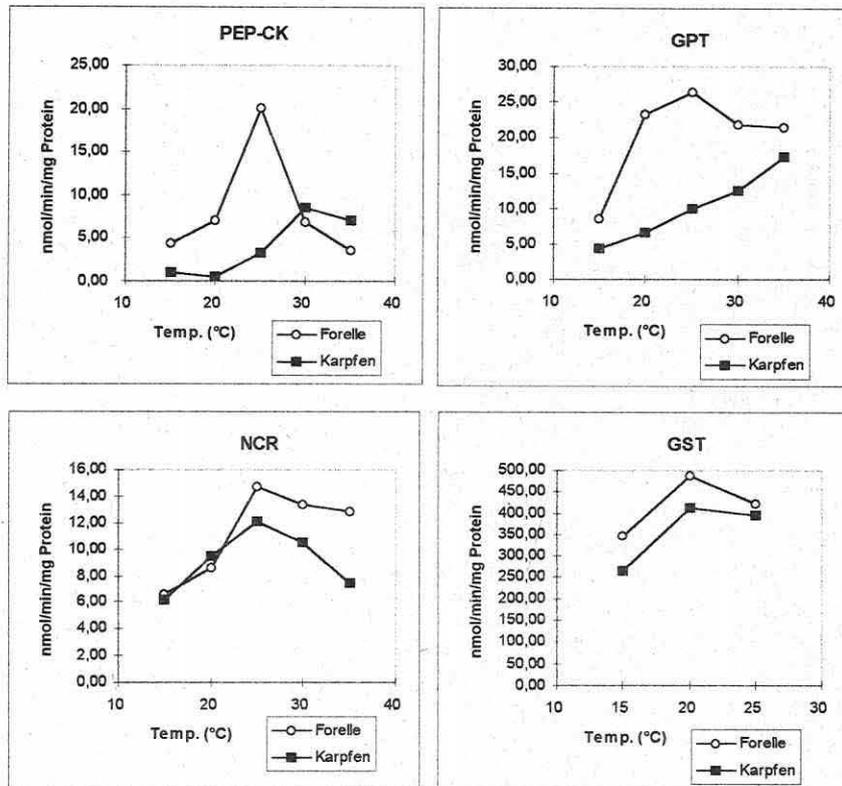


Abb. 6.3: Temperaturoptimum von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), NADPH-Cytochrom c (P450)-Reduktase (NCR) und Glutathion-S-Transferase (GST). Gemessen wurde im 10 000 g Überstand von Leberhomogenat unbehandelter Forellen und Karpfen.

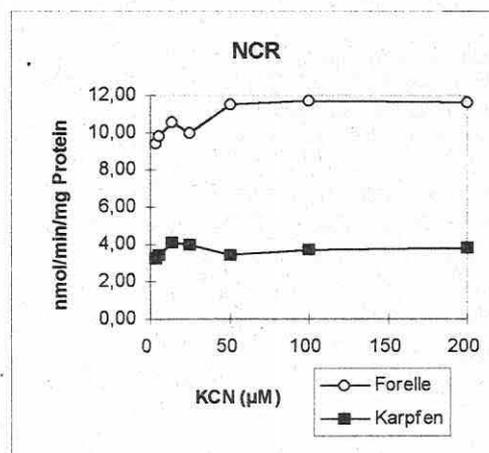


Abb. 6.4: Abhängigkeit der NCR-Aktivität von der KCN-Konzentration. Gemessen wurde im 10 000 g Überstand von Leberhomogenat unbehandelter Forellen und Karpfen.

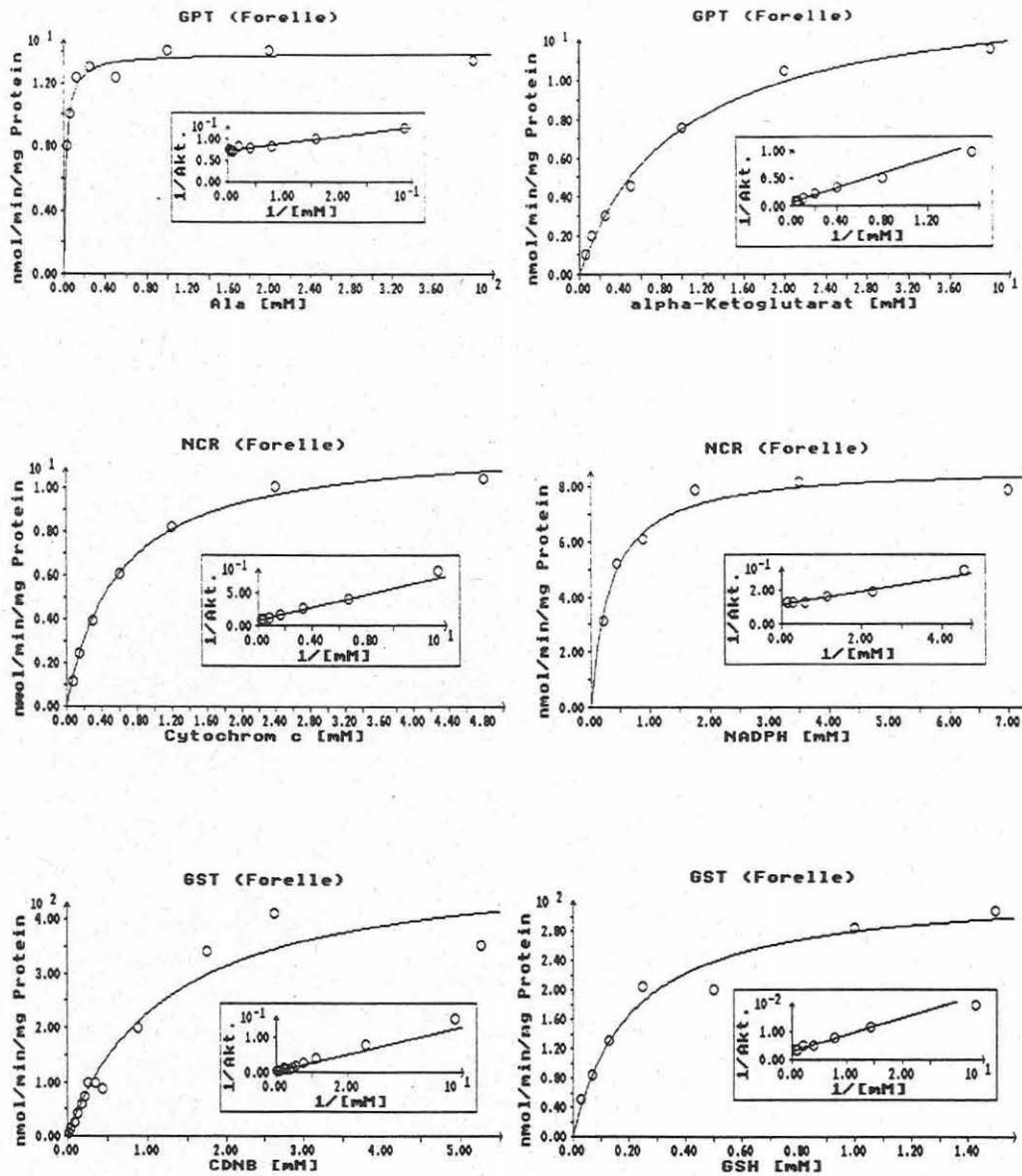


Abb. 6. 5: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Substratkonzentration bei drei verschiedenen Enzymen aus der Forellenleber: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), NADPH-Cytochrom c (P450) Reductase (NCR) und Glutathion-S-Transferase (GST) wurden im Leberhomogenat gemessen.

6. Vergleich von Karpfen und Forelle

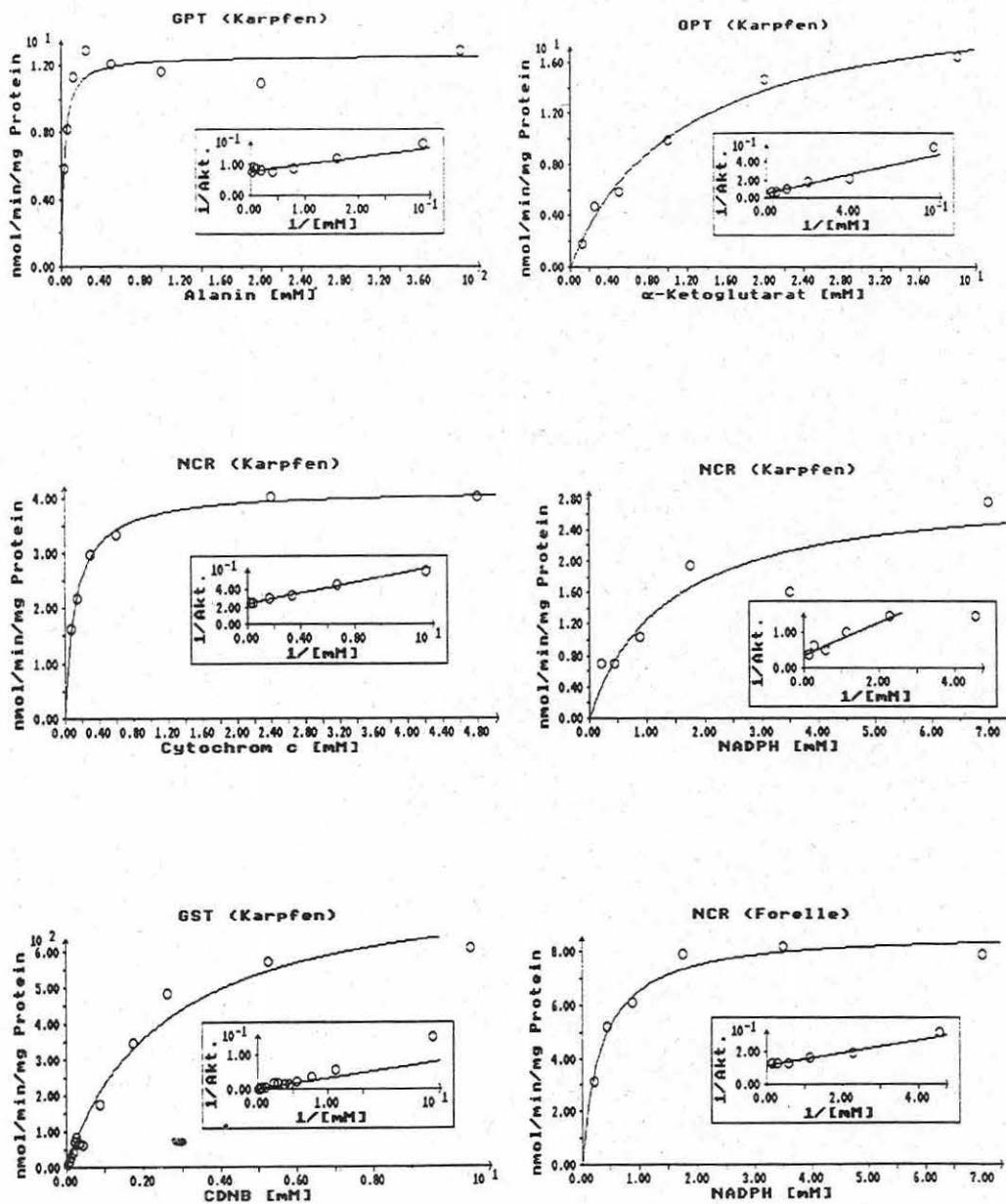


Abb. 6. 6: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Substratkonzentration bei drei verschiedenen Enzymen aus der Karpfenleber: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), NADPH-Cytochrom c (P450) Reductase (NCR) und Glutathion-S-Transferase (GST) wurden im Leberhomogenat gemessen.

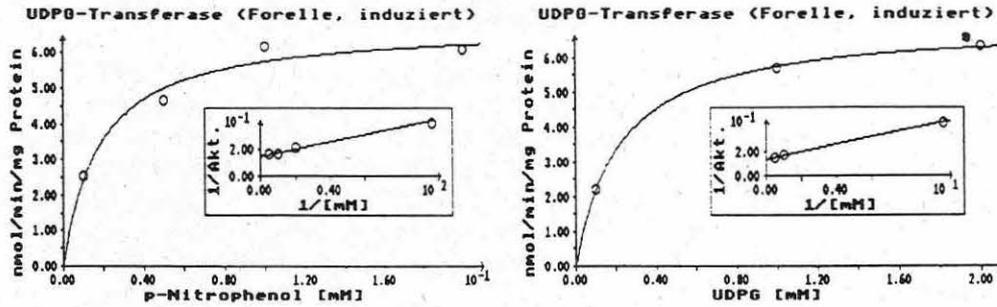


Abb. 6.7: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Substratkonzentration der UDP-Glucuronosyltransferase in Mikrosomen aus der Leber von BNF-induzierten Forellen.

Enzym	Substrat	Forelle			Karpfen		
		Protein (mg/ml)	$K_m$ -Wert (mM)	$V_{max}$ -Wert (nmol/min/mg Prot.)	Protein (mg/ml)	$K_m$ -Wert (mM)	$V_{max}$ -Wert (nmol/min/mg Prot.)
GPT	Alanin	0,20	2,2	14	0,17	2,9	13
	$\alpha$ -Ketogl.	0,20	9,7	15	0,17	1,1	22
NCR	Cyt. c	0,20	0,59	12	0,17	0,13	4,1
	NADPH	0,20	3,4	8,8	0,17	1,3	2,9
GST	CDNB	0,020	1,2	510	0,017	2,5	800
	GSH	0,020	2,1	340	0,017	0,69	411
UGT.	p-NP	0,29	17 <sup>***</sup>	6,8			
	UDPG	0,29	0,21	7,0			

\*\*\* Angabe in nM

Tab. 6.1:  $V_{max}$  und  $k_m$ -Werte von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), NADPH-Cytochrom c (P450)-Reductase (NCR), Glutathion-S-Transferase (GST) und UGT (UDP-Glucuronyltransferase). Die kinetischen Parameter wurden im Leberhomogenat nicht induzierter Forellen und Karpfen für beide an der Reaktion beteiligten Substrate bestimmt.  $V_{max}$  und  $k_m$ -Werte der UDPG-Transferase konnten nur für Mikrosomen von BNF behandelten Forellen berechnet werden.

### 6.3.5 Vergleich von Leberzellkulturen aus Karpfen und Forelle

Die Ergebnisse des Kapitels 4 haben gezeigt, daß insbesondere für die Entwicklung der CYP1A1-Aktivität EROD große Unterschiede zwischen Leberzellkulturen von Forelle und Säugern zu beobachten sind. Durch Vergleich von Forellen- mit Karpfenprimärkulturen sollte überprüft werden, ob derartige Unterschiede auch innerhalb einer Tiergruppe wie den Fischen aufzufinden waren. Die Kultur der Karpfenhepatozyten erfolgte durch Dr. R. Böhm an der Universität Karlsruhe, während alle Messungen von mir selbst am UFZ in Leipzig durchgeführt wurden.

Es zeigte sich, daß die Anheftungsrate der Hepatozyten an das Substrat in beiden Kultursystemen gleich ausfiel, wenn der Proteingehalt der Homogenate als Grundlage genommen wurde. Das Absinken des Proteingehaltes fiel bei verlängerter Kulturdauer für die Karpfenhepatozyten etwas stärker aus. Der DNA-Gehalt beider Kulturen deutete dagegen eine bessere Anheftung der Karpfenhepatozyten an. Zunächst konnte für den Karpfen sogar ein leichter Anstieg der DNA-Menge beobachtet werden, was auf eine mögliche Proliferation der Zellen hindeutete. Nach 5 Tagen Kulturdauer konnte aber auch hier ein Absinken des DNA-Gehaltes beobachtet werden.

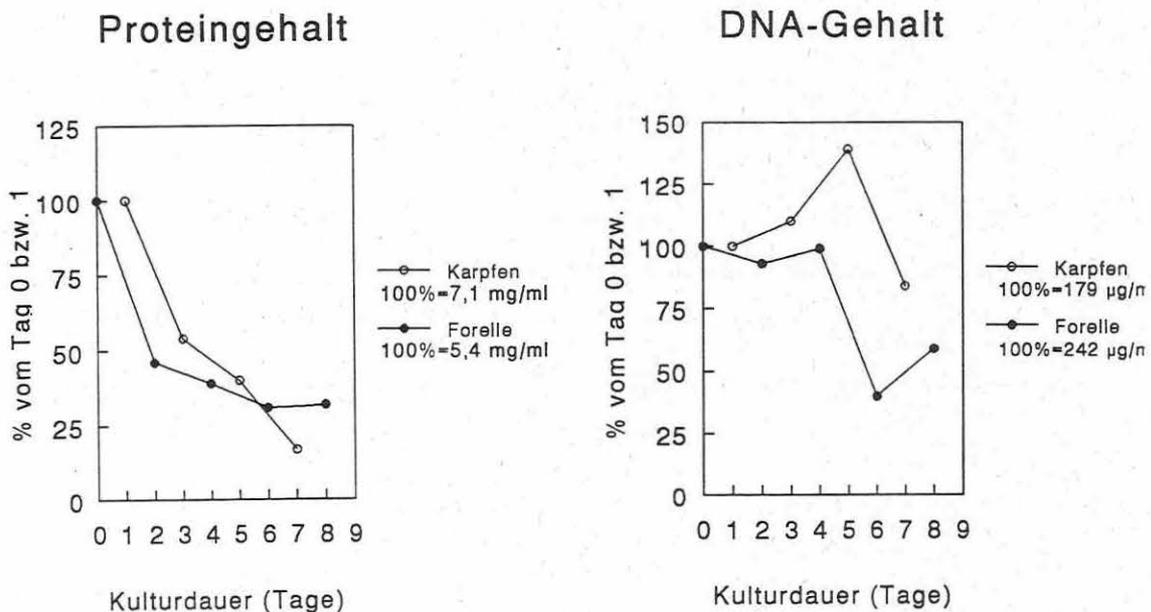


Abb. 6.8: DNA- und Proteingehalt im Homogenat von Primärhepatozyten aus Forelle und Karpfen. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus 3 (Forelle) bzw. 2 Isolationen (Karpfen).

Um Karpfen- und Forellenhepatozyten besser miteinander vergleichen zu können wurden in den Diagrammen anstatt relativer Werte (wie im Kapitel 4 und 5) die absoluten Enzymaktivitäten angegeben. Die hieraus resultierenden hohen Standardabweichungen erlauben aber keine statistische Signifikanzanalyse und wurden in den Diagrammen daher nicht dargestellt. Für den Protein- und DNA-Gehalt wurde eine prozentuale Darstellung gewählt, da diese in großem Maße von der Dichte der anfänglich eingesäten Zellmenge abhängen. Da

abhängen. Da für die Karpfenhepatozyten keine Proben von frisch isolierten Zellen genommen wurden, mußten die Prozentwerte auf den ersten Probennahmetag bezogen werden.

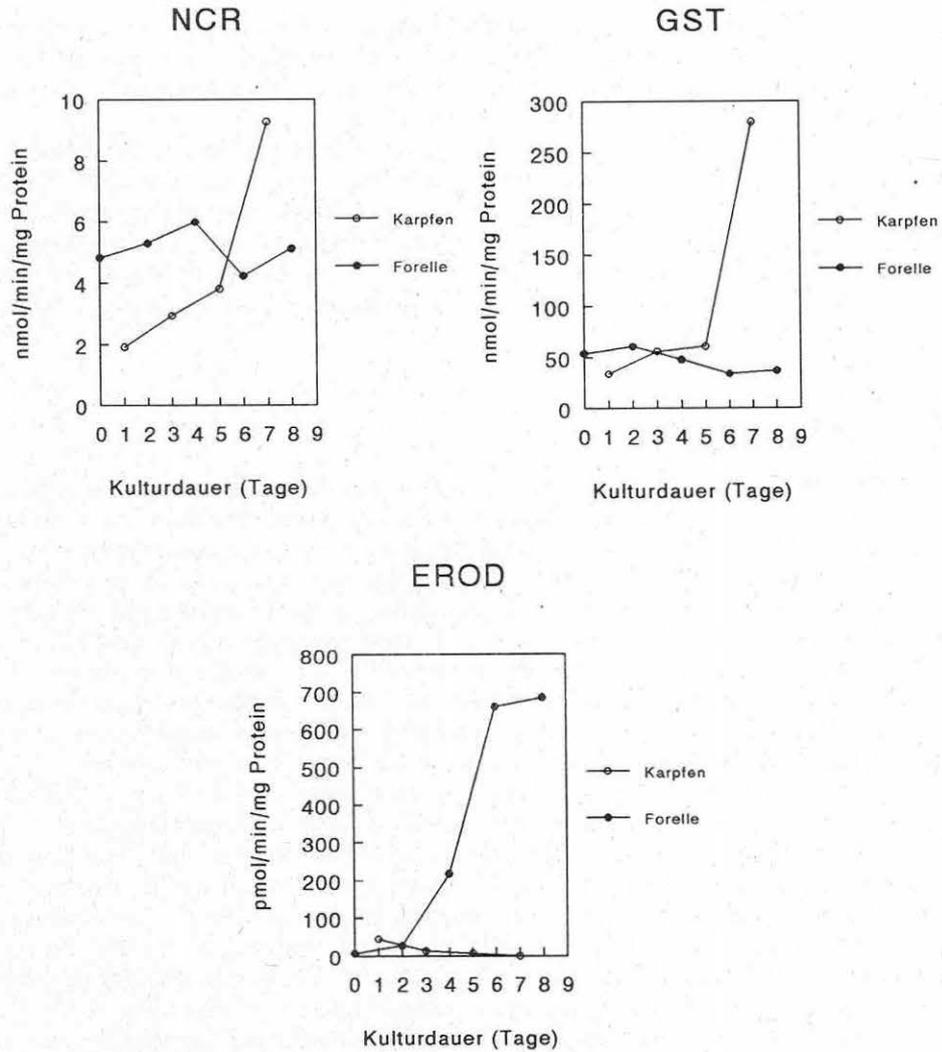


Abb. 6.9: Enzymaktivitäten von NCR, GST und EROD in Primärkulturen von Hepatozyten aus dem Karpfen und der Forelle. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus 3 (Forelle) bzw. 2 Isolationen (Karpfen).

## 6. Vergleich von Karpfen und Forelle

Große Unterschiede zwischen der Kultur von Karpfen und Forellenhepatozyten bestanden zum Teil für die zeitabhängige Expression verschiedener Biotransformationsenzyme. NCR konnte in Karpfen und Forellen mit einer Aktivität in der gleichen Größenordnung gemessen werden (2-9 nmol/min/mg Protein). Jedoch konnten Differenzen bei verlängerter Kulturdauer beobachtet werden. Während in den Forellenprimärkulturen die Aktivität der NCR mehr oder weniger stabil blieb, so konnte für den Karpfen ein kontinuierlicher Anstieg verzeichnet werden.

Für die GST konnten ähnlich hohe Enzymaktivitäten in den ersten 4-5 Kulturtagen bei Karpfen und Forelle beobachtet werden. Bei verlängerter Kulturdauer zeigte die Karpfen-GST aber eine um ca. 6fach erhöhte Aktivität, während in Forellenhepatozyten ein leichtes Absinken der Enzymaktivität beobachtet werden konnte.

Genau umgekehrte Verhältnisse existierten dagegen für die Expression des Phase 1-Biotransformationsenzyms EROD. Wie bereits im Kapitel 4 ausführlich diskutiert, konnte in Forellenhepatozyten ein kontinuierlicher Anstieg von wenigen pmol/min/mg Protein in frisch isolierten Zellen bis zu über 100 pmol/min/mg Protein in 8 Tage kultivierten Zellen verzeichnet werden. Die Aktivitäten der Karpfen EROD lag dagegen am ersten Kulturtag bei ca. 50 pmol/min/mg Protein und sank mit fortschreitender Kulturdauer auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab.

### 6.4 Diskussion

Bei der Entwicklung und Anwendung von *in vivo*- und *in vitro*-Modellen stellt sich immer wieder die Frage nach der Allgemeingültigkeit bzw. der Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf andere Spezies (innerhalb der gleichen Klasse oder auch zwischen verschiedenen Tierklassen). Dies gilt ganz besonders für die Beurteilung der Schadwirkung von Chemikalien, die durch die Aktivitäten des Menschen in die Umwelt gelangt sind. Da aus praktischen Gründen immer nur einige wenige Tierarten einer Klasse z.B. der Fische für die notwendigen Untersuchungen in Frage kommen, ist es von großer Bedeutung, die kritischen Punkte aufzuzeigen, d.h. zu bestimmen, an welchen Stellen sehr starke Speziesunterschiede - begründet durch unterschiedliche Lebensräume und Anpassungen - auftreten und welche Mechanismen mehr oder weniger gleich ausgeprägt vorzufinden sind.

Im konkreten Fall der Untersuchung der Biotransformation könnten sich aus einem Vergleich der Biotransformationsaktivitäten folgende Problemstellungen ergeben:

Da die Biotransformation wesentlichen Einfluß auf den Verbleib, den Abbau und die Schadwirkung eines potentiellen Umweltschadstoffes hat, können die Biotransformationskapazitäten (ausgedrückt durch die spezifischen Enzymaktivitäten und verschiedenen Enzymcharakteristika) von großer Bedeutung bei der Beurteilung des Risikopotentials haben. Würden einige wenige Spezies sehr hohe oder sehr geringe Biotransformationskapazität zeigen, so könnte eine Betrachtung nur dieser Spezies zu falschen Schlußfolgerungen führen. Umgekehrt kann auch eine gesonderte Betrachtung einzelner Spezies sinnvoll sein, wenn diese sich von generellen Befunden abheben. Da Biotransformation auch zu einer Aktivierung, d.h. zu einer Erhöhung der Toxizität führen kann, ist eine besondere, selektive Gefährdung einzelner Spezies denkbar.

Ein Beispiel für die extreme Spezies-Selektivität für toxische Chemikalien, die unter Umständen durch die Biotransformation vermittelt wurde, konnte beim Sandoz-Chemieunfall (1. November 1986) im Rhein bei Basel beobachtet werden. Das Austreten verschiedener Organophosphatinspektizide führte in einigen Bereichen zu einem kompletten Aussterben der Aalpopulation. Für eines der in den Rhein gelangten Organophosphate, Dinitro-o-

resol, konnte neben histologischen Veränderungen der Leberzellen auch eine Induktion verschiedener Biotransformationsenzyme nachgewiesen werden. Dabei wurde diskutiert, daß eine Ursache für die selektive Toxizität für Aale möglicherweise in einer spezifischen Induktion der Biotransformationsenzyme des Aals durch Dinitro-o-cresol und der daraus resultierender Aktivierung eines oder mehrerer Organophosphate liegen könnte (Braunbeck & Voelkl, 1991).

Vor diesem Hintergrund wurden in diesem Kapitel daher verschiedene Enzyme aus der Leber von Regenbogenforellen und Karpfen eingehender charakterisiert. Die Optima für Temperatur, pH-Wert und die Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden untersucht und  $k_m$ - und  $V_{max}$ -Werte daraus abgeleitet. Dabei wurden sowohl verschiedene Biotransformationsenzyme der Phase 1 und 2 als auch nicht unmittelbar an der Biotransformation beteiligten Stoffwechsellenzyme untersucht, um festzustellen ob die aufgefundenen Unterschiede z.B. bezüglich der Temperatur bei allen Enzymen oder nur bei einer bestimmten Enzymklasse wie den Biotransformationsenzymen aufzufinden waren. Die beiden untersuchten Fischarten reichen natürlich nicht aus, um eine umfassende Aussage bezüglich einer Verallgemeinerung zu geben. Auch wurden keine Daten über eine unterschiedliche Induktionsantwort erhoben. Jedoch sollen die durchgeführten Experimente demonstrieren, welche Bedeutung eine Charakterisierung der Enzyme hat und ob bzw. welche Unterschiede auftreten können.

Zu diesem Zweck wurden zwei Fischarten gewählt, bei denen es sich, um Vertreter zweier verschiedener Familien, der Salmoniden (Lachsartige) und der Cypriniden (Karpfenartige) handelt. Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) unterscheiden sich bezüglich ihres Lebensraumes, ihren Nahrungsgewohnheiten und ihrer Ansprüche an Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt. Im folgenden soll gezeigt werden, welche Unterschiede auftreten, ob diese von Bedeutung für die Beurteilung von Biotransformationskapazitäten sein könnten und inwieweit sie mit den unterschiedlichen Lebensgewohnheiten der beiden Fischarten in Verbindung gebracht werden können.

Bei der pH-Wert-Abhängigkeit wurden die größten Unterschiede zwischen Forelle und Karpfen festgestellt. Die Biotransformationsenzyme EROD, ECOD und NCR zeigten in der Forelle Optima im alkalischen Bereich, während diese Optima beim Karpfen weniger stark ausgeprägt waren (NCR) oder ähnlich hohe oder die höchsten Aktivitäten im sauren pH-Bereich zeigten (ECOD und EROD). Ganz besonders stark fielen hierbei die Unterschiede für EROD zwischen dem Karpfen und der Forelle auf. Dies muß berücksichtigt werden, wenn z.B. die Enzymaktivitäten von Leberzellkulturen beider Spezies verglichen werden. Werden beide Aktivitäten bei gleichem pH-Wert gemessen, so ist offensichtlich, daß sich andere Verhältnisse ergeben müssen, als wenn die pH-Optima des jeweiligen Spezies zugrunde gelegt werden. Unberücksichtigt bleibt hierbei natürlich auch, inwieweit die gefundenen pH-Optima überhaupt den physiologischen Optima bzw. dem physiologischen pH-Wert entsprechen.

Unter dem Blickwinkel, daß die Induktion der Biotransformationsenzyme zur Erkennung einer Belastung mit organischen Schadstoffen oder in Struktur-Wirkungsanalysen eingesetzt werden sollen, empfiehlt sich die Messung der einzelnen Enzyme im jeweiligen Optimum. Will man jedoch die Kapazität zur Metabolisierung durch die Leber von Karpfen und Forelle vergleichen, so müßte der physiologische pH-Wert zugrunde gelegt werden. Der physiologische pH-Wert ist für die Leberzellen der untersuchten Spezies nicht beschrieben. Im allgemeinen dürfte dieser aber im neutralen Bereich liegen. Wie die Abb. 6.2 zeigt kann sich hierbei jedoch schon bei geringfügigen Verschiebungen eine Umkehrung der Verhält-

## 6. Vergleich von Karpfen und Forelle

nisse einstellen. Während bei pH 7 die EROD Aktivität der Karpfenleber deutlich höher als bei der Forelle lag, konnte ein gegenteiliges Verhältnis bei pH 8 gefunden werden.

Die Unterschiede bezüglich der pH-Optima für EROD, ECOD und NCR könnten eventuell mit Unterschieden im Stoffwechsel der beiden Tiere begründet werden. Im Gegensatz zur Forelle ist der Karpfen zu einem anaeroben Stoffwechsel (insbesondere während der Wintermonate) fähig. Die Regeneration der Reduktionsäquivalente findet dann durch Umsetzung des in der Glykolyse entstandenen Pyruvats in Lactat statt. Die Folge könnte eine pH-Wert-Senkung sein und zu den beobachteten Unterschieden bei den pH-Optima führen. Da aber keine Werte bezüglich der intrazellulären pH-Werte für Karpfen und Forelle vorliegen, und darüber hinaus die Stoffwechsellzyme GPT und PEP-CK diese Unterschiede nicht zeigten, könnten auch noch andere Ursachen für diese Unterschiede in Betracht kommen. Je nach pH-Wert würde man also der Forelle oder dem Karpfen eine höhere Kapazität zu Metabolisierung zuordnen (sofern sich keine Änderung durch die Induktion von Cytochrom-P450 Enzymen ergibt).

Die Ergebnisse der Temperaturabhängigkeit für die Enzyme PEP-CK, GPT, NCR und GST spiegeln möglicherweise die größere Temperatursensibilität der Forelle wieder (Abb. 6.3). Übereinstimmend mit der relativ großen Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen zeigten alle untersuchten Enzyme der Forelle ein Temperaturoptimum bei 25 bzw. 20°C (GST). Der Karpfen zeigte dagegen eine wesentlich geringere ausgeprägte Temperatursensibilität. Während für die GPT innerhalb des Meßbereichs überhaupt kein Optimum nachgewiesen werden konnte, hatte die PEP-CK ihr Optimum bei 30°C mit einer relativ hohen Toleranz für höhere Temperaturen. NCR und GST zeigten dagegen mit der Forelle vergleichbare Temperaturcharakteristika.

Für die Enzyme NCR, GST und GPT wurden auch  $k_m$ - und  $V_{max}$ -Wert bestimmt. Keine großen Unterschiede konnten zwischen Forelle und Karpfen für diese drei Enzyme und ihre Affinität zu den einzelnen Substraten beobachtet werden.

Die Meßmethode für das Enzym NCR kann je nach Modifikation sowohl für die Messung der NADH-Cytochrom c-Reduktase als auch der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase eingesetzt werden. Die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wird indirekt mit Hilfe von Cytochrom c als Akzeptormolekül durchgeführt. Die Kontamination mit Mitochondrien kann dabei mit diesem Nachweis interferieren. Daher wird dem Meßansatz KCN zugeführt, um die nicht-mikrosomale Aktivität zu blocken (Kennedy, C.J., 1994).

Die gefundenen spezifischen Aktivitäten für NCR sind relativ hoch im Vergleich zu den gemessenen P450-Enzymaktivitäten. Während NCR spezifische Aktivitäten im Bereich von 10 nmol/min/mg Protein erreichten (Abb. 6.2), wurden für die EROD-Aktivität nur 21 pmol/min/mg Protein in Lebern von Kontrolltieren und bis zu 0,38 pmol/min/mg Protein in Lebern (Homogenat) induzierter Tiere gemessen (Tab. 1.1). Da beide Enzymaktivitäten unmittelbar miteinander gekoppelt sind, indem NCR die Elektronen auf Cytochrom P450 überträgt, wo sie auf ein geeignetes Akzeptorsubstrat übertragen werden, erscheint die NCR-Aktivität hier überraschend hoch. Daher wurde die Hemmung der mitochondrialen NCR durch KCN untersucht. Bei sehr niedrigen KCN Konzentrationen konnte eine etwas geringere NCR-Aktivität beobachtet werden. Ein hemmenden Effekt von KCN für die nicht-mikrosomalen NCR Aktivitäten konnte demnach nicht festgestellt werden. Unter der Voraussetzung, daß KCN die Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase tatsächlich effektiv hemmt, müßte das Fehlen einer nicht-mikrosomalen NCR angenommen werden. Möglicherweise wird die mitochondriale NCR aber entgegen den Literaturangaben nicht durch KCN gehemmt, so daß es zu den hohen Aktivitäten der NCR kommt. Dieser Annahme würde allerdings widersprechen, daß der bevorzugte Elektronendonator für die

Cytochrom c-Reduktase NADH und nicht NADPH ist, so daß man davon ausgehen könnte, daß die gemessenen Werte tatsächlich der Cytochrom P450-Reduktase zuzuordnen sind.

Da Fische genauso wie Säuger ein komplexes Cytochrom P450-System mit einer Vielzahl verschiedener Isoenzyme besitzen (Goksøyr & Förlin, 1992; Stegeman et al., 1990), lassen sich die hohen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Aktivitäten daher möglicherweise damit erklären, daß die Elektronen nicht nur auf das durch die EROD gemessene Isoenzym CYP1A1, sondern auch auf eine Vielzahl anderer P450-Isoenzyme, die hier nicht erfaßt wurden, übertragen werden.

Die Abb. 6.2 bis 6.4 zeigen eine deutlich höhere NCR-Aktivität für die Forelle ( $\approx 10$  nmol/min/mg Protein) im Vergleich zum Karpfen ( $\approx 4$  nmol/min/mg Protein). Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß das für die Enzymcharakterisierung verwendete Leberhomogenat von jeweils nur einem Tier stammte. Wie aber bereits im Kapitel 3 dieser Arbeit gezeigt wurde, sind die individuellen Schwankungen sehr hoch, so daß ein Vergleich absoluter Aktivitätswerte zwischen den beiden verwendeten Spezies hier nicht möglich ist. Hiervon unberührt bleibt aber die Bestimmung von Temperatur-, pH-Optima und  $k_m$ -Wert.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, daß eine Überprüfung der Biotransformationsenzyme auf Spezies-spezifische Besonderheiten keinesfalls trivial ist. Während die meisten der hier gemessenen Stoffwechsel- und Biotransformationsenzyme keine dramatischen Unterschiede zwischen dem Karpfen und der Regenbogenforelle erkennen ließen, konnte insbesondere für die Phase 1- und CYP1A1-charakteristische Enzymaktivität EROD eine gravierender Unterschied bezüglich des pH-Optimums festgestellt werden. Es bleibt allerdings noch zu klären, ob die gemessenen Unterschiede auch tatsächlich physiologischen Unterschieden entsprechen. Hier müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie z.B. die Messung der EROD-Aktivität in intakten Zellen (Donato et al., 1992; Kennedy, S.W. et al., 1993) anstelle von Leberhomogenaten.

Größere Speziesunterschiede demonstrierten auch der Vergleich von Primärkulturen aus der Leber von Forellen und Karpfen. Die Entwicklung des DNA-Gehaltes in der Primärkultur des Karpfens (Anstieg um 50 % bis zum 5. Kulturtag) deutete daraufhin, daß die Karpfenhepatozyten möglicherweise noch für einige Tage die Fähigkeit zur Proliferation besitzen könnten.

Die zu beobachtenden Unterschiede in der zeitlichen Expression der verschiedenen Enzymaktivitäten waren wesentlich größer als die Unterschiede im Homogenat der Leber. Insbesondere für die Biotransformationsenzyme EROD und GST konnten Differenzen zwischen den Zellkulturen aus Karpfen und Forelle beobachtet werden. Während die GST-Aktivität mit fortgesetzter Kulturdauer in Forellenhepatozyten leicht abnimmt, konnte im Karpfen eine starke Zunahme nach 7 Tagen Kulturdauer beobachtet werden (Abb. 6.9). Die Befunde zur Entwicklung der EROD-Aktivität zeigten für den Karpfen eine ähnliche Entwicklung wie in Säugersystemen, wo ein Absinken der CYP1A1-Aktivitäten mit längerer Kulturdauer beobachtet werden konnte (Donato et al., 1990, 1991; Niemann et al., 1991). Die Forelle und die in ihren Hepatozytenkulturen ansteigenden EROD-Aktivitäten scheint demnach eher eine Sonderstellung einzunehmen und keine für die Fische typischen Verhältnisse zu repräsentieren. Für eine genauere Überprüfung, inwieweit die bei der Forelle oder dem Karpfen gefundenen Entwicklung der Biotransformationsenzyme typisch für die Fische oder die jeweilige Fischfamilie ist, müßten aber noch weitere Spezies untersucht werden.

Die verschiedenen Fischarten zeigen in der Tat Unterschiede in der *in vivo*-Expression ihrer Biotransformationsenzyme. Insbesondere die EROD Aktivität ist für viele Fischarten untersucht. Der Vergleich zwischen Untersuchungen verschiedener Autoren ist aber oft schwie-

## 6. Vergleich von Karpfen und Forelle

rig, da die Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen vorgenommen wurden. Häufig wurden die Tiere aus dem Freiland entnommen, so daß eine Belastung mit Schadstoffen, die eine Induktion hervorrufen, nicht ausgeschlossen werden kann. Außerdem wirken sich die Temperaturaklimatisierung und die Jahreszeit der Messung auf die Enzymaktivitäten aus (Lange, U. et al., 1994; Vindimian & Garric, 1989). In der Tabelle 6.2 wurden daher die Ergebnisse zweier Studien zusammengefaßt, bei der jeweils 3 bzw. 2 Fischarten miteinander verglichen wurden: Die von (Monod et al., 1988) untersuchten Fische stammen aus relativ unbelasteten Regionen der Rhône in Frankreich. Die Untersuchungen von (Goksøyr et al., 1987) basieren auf Laborexperimenten und wurden daher zum Vergleich mit den Werten für EROD in der Mikrosomenfraktion von Kontrollforellen aus der hier vorliegenden Untersuchung herangezogen. Wie die Ergebnisse zeigen, bestehen zwar Unterschiede zwischen den einzelnen Fischarten, jedoch befinden sich diese innerhalb einer Größenordnung. Die in dieser Untersuchung gemessene Werte für die Regenbogenforelle lagen im gleichen Bereich wie die von (Goksøyr et al., 1987). Auch reagieren alle der hier gezeigten und andere Fischarten auf die Induktion mit BNF oder die Belastung mit bestimmten Umweltschadstoffen mit einer Erhöhung ihrer EROD Aktivität (Goksøyr et al., 1987; Monod et al., 1988; Vindimian & Garric, 1989) (siehe Kapitel 2 und 4).

<b><u>EROD-Aktivität in Fischen der Rhône:</u></b>			
	Nase <sup>+</sup>	Äsche <sup>+</sup>	Plötze <sup>+</sup>
pmol/min/mg Protein	4 ± 3 (10)	76 ± 42 (7)	7 ± 3 (9)
<b><u>EROD Aktivität bei Dorsch und Forelle aus Laborexperimenten</u></b>			
	Dorsch <sup>**</sup>	Forelle <sup>**</sup>	Forelle <sup>***</sup>
pmol/min/mg Protein	84 ± 8 (5)	19 ± 27 (5)	21 ± 8 (3)
<sup>+</sup> (Monod et al., 1988) <sup>**</sup> (Goksøyr et al., 1987) <sup>***</sup> aus Messungen in dieser Arbeit			

Tab. 6.2: EROD Aktivitäten in der Mikrosomenfraktion der Leber verschiedener Fische. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung (Anzahl der Tiere) angegeben.

Unter diesem Aspekt scheint eine Extrapolation von mit einer Art gewonnenen Daten auf die meisten anderen Fischspezies prinzipiell gerechtfertigt. Dennoch können für einige Spezies aufgrund ihrer Lebensweise und besonderer physiologischer und biochemischer Merkmale Abweichungen von den generellen Befunden auftreten. Auch müssen *in vitro*-Systeme und ihre Abweichungen zu *in vivo*-Systemen und zu den *in vitro*-Systemen anderer Spezies genau charakterisiert werden, bevor Spezies-übergreifende Aussagen gemacht werden können. Dies muß bei einer Risikoanalyse für die Toxizität und Bioakkumulation von Chemikalien anthropogener Herkunft in der Umwelt berücksichtigt werden.

## 7. Biotransformationsenzyme in Zelllinien aus Regenbogenforelle und Karpfen

### 7.1 Zusammenfassung

Drei verschiedene Zelllinien aus der Regenbogenforelle (RTG, RTH und R1), für die z.T. eine Metabolisierung von Fremdstoffen oder eine Induktion von CYP1A1 beschrieben wurde, und eine Epithelzelllinie aus dem Karpfen (EPC) wurden auf ihren Gehalt an Cytochrom P450 und die Aktivität mehrerer Biotransformations- und charakteristischer Leberenzyme untersucht. Die erhaltenen Werte wurden mit den Aktivitäten dieser Enzyme in 2 Tage alten Primärkulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle verglichen. Cytochrom P450 und EROD konnten in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dagegen waren das für die Funktion der P450 Enzyme essentielle Elektronentransferenzym NADPH-Cytochrom c(P450)-Reduktase (NCR), das Konjugationsenzym Glutathion-S-Transferase (GST) und das Stoffwechsellenzym Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEP-CK) in fast allen der untersuchten Zelllinien vorhanden. Die Aktivitäten waren vergleichbar mit Enzymaktivitäten aus Primärhepatozyten. Auch nach Induktion mit  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) und Benzo(a)pyren (BAP) konnte weder immunologisch noch enzymatisch CYP1A1 nachgewiesen werden. Auf die Aktivitäten von GST hatte die Inkubation von RTG- oder RTH-Zellen mit BAP und BNF keinen signifikanten Einfluß.

### 7.2 Einleitung

Fischzelllinien wurden ursprünglich für die Untersuchung von Fischviren und -krankheiten entwickelt und eingesetzt (Hightower & Renfro, 1988; Lannan et al., 1984; Wolf & Mann, 1980). Die Arbeiten der Arbeitsgruppe von Babich & Borenfreund (1991) sowie die Diskussion um den in Deutschland vorgeschriebenen Fischtest für Abwasser und Chemikalienentwicklung rückte die mögliche Nutzung von Fischzelllinien als Alternative zum Fischtest in den Mittelpunkt (Ahne, 1985; Rusche & Kohlpott, 1993). Verschiedene Zelllinien, darunter auch die R1- und die RTG-2-Zelle, wurden für die Bestimmung von  $EC_{50}$ -Werten in Toxizitätsuntersuchungen mit den Endpunkten Kristallviolett, Neutralrot und MTT eingesetzt. Generell korrelierten die *in vitro*-Daten mit den *in vivo*-Untersuchungen. (Lange, M. et al., 1995; Lenz et al., 1993; Segner & Lenz, 1993).

Die Toxizität vieler Stoffe wird durch ihre Metabolisierung beeinflusst. Es stellt sich daher die Frage, in welchem Maße Zelllinien diesen Metabolismus durchführen können. Viele Zelllinien verfügen über keine oder nur geringe Mengen der Phase I Biotransformationsenzyme. Sie erfordern daher den Zusatz von externen metabolisierenden Systemen (Fry, 1982). Als metabolisierende Systeme wurden dabei entweder Kokulturen von Hepatozyten und Zelllinien oder der Zusatz von S9-Mix zum Medium bzw. eine Prä-Inkubation mit S9-Mix angewandt. Als Modellschubstanz für derartige Untersuchungen diente dabei häufig Cyclophosphamid, ein Zytostatikum, daß bei der Bekämpfung von Krebs eingesetzt wird. Beispielsweise ließ sich eine Toxizität von Cyclophosphamid auf die etablierte 3T3-Säugerzelllinie nur in der Kokultur mit Hepatozyten nachweisen (Voss & Seibert, 1991). Auch die Primärzellen alleine wären in diesem Fall kein geeignetes Testsystem gewesen, da sie nicht mehr teilungsfähig sind und Wirkungen, die nur bei proliferierenden Zellen auftreten, nicht nachgewiesen werden können. Eine ähnliche Funktion wie die Kokultur mit Hepatocyten

## 7. Biotransformationsenzyme in Zelllinien

kann der S9-Mix erfüllen. Der S9-Mix kann aus homogenisierter und zentrifugierter Leber (9000 g Überstand) verschiedener Tiere gewonnen werden. Im S9-Mix befinden sich u.a. die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierten Cytochrom P450-Enzyme. Er wird routinemäßig als Aktivierungssystem im Ames-Mutagenitätstest eingesetzt. Johnson (1990) verglich den Einfluß von S9-Mix aus Forellen- und Rattenleber auf die Aktivierung verschiedener Promutagene im *Salmonella*-Mutagenitätstest. Während hier keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden konnten, zeigte sich bei der Verwendung in Zellkulturtests eine Speziesabhängigkeit dahingehend, daß mit dem Forellen-S9-Mix im Gegensatz zum Ratten-S9-Mix keine Toxizität von Cyclophosphamid festgestellt werden konnte (Hauck, 1993).

Gegenüber Primärkulturen bieten permanente Zelllinien einen großen Vorteil in der Handhabung sowie bei der Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse. In Primärkulturen von Leberzellen muß, wie in den Kapiteln 4 und 5 ausführlich dargestellt wurde, mit relativ hohen physiologischen Schwankungen gerechnet werden. Daher müssen relativ viele Wiederholungsversuche ( $>>3$ ) durchgeführt werden, wenn statistisch signifikante Aussagen gemacht werden sollen. Die Isolation von Leberzellen stellt zwar im Vergleich zu Tierversuchen immer noch einen geringeren Aufwand mit einer drastisch reduzierten Anzahl der benötigten Tiere dar. Gegenüber den routinemäßig durchgeführten Tests mit Zelllinien stellt sie aber wesentlich höhere Anforderungen an Zeit-, Gerätebedarf und die Qualifikation des Personals, so daß der Einsatz für Routineanwendungen kaum möglich ist.

In dieser Arbeit wurden 4 verschiedene in toxikologischen Untersuchungen z.T. häufig eingesetzte Fischzelllinien auf ihren Gehalt an Biotransformationsenzymen und deren Induzierbarkeit untersucht und mit Primärkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle verglichen. Folgende Zelllinien wurden verwendet:

1. Die R1-Zelllinie wurde 1985 von Ahne aus der Leber der Regenbogenforelle isoliert und seitdem mehrfach für Toxizitätsuntersuchungen eingesetzt (Ahne, 1985; Lenz et al., 1993; Segner & Lenz, 1993; Zahn et al., 1993).
2. Die RTG-Zelllinie wird zur Zeit für den Einsatz als gesetzlich vorgeschriebener Toxizitätstest - im Ersatz für den Fischtest - in verschiedenen Laboratorien in Deutschland evaluiert (pers. Mitteilung H. Segner, UFZ Leipzig-Halle GmbH). Sie wurde von (Wolf & Quimby, 1962) aus der Gonade der Regenbogenforelle isoliert. Im Vergleich mit anderen Zelllinien aus poikilothermen und homöothermen Vertebraten zeigte sie eine relativ hohe Fähigkeit zur Metabolisierung von Benzo(a)pyren (Diamond & Clark, 1970).
3. In RTH-149 Zellen, aus einem Leberhepatom der Regenbogenforelle isoliert (Fryer et al., 1981), konnte ein Ah-Rezeptor nachgewiesen werden (Lorenzen & Okey, 1990).
4. Die EPC ist die einzige für den Karpfen erhältliche Zelllinie und wurde erstmals 1983 beschrieben (*Am. Virol. Inst. Pasteur* 1983; 134: 207).

### 7.3 Ergebnisse

In 3 verschiedenen Zelllinien aus der Regenbogenforelle, die im Kapitel 4 hinsichtlich ihres Einflusses auf die Stabilisierung von Hepatozytenkulturen untersucht wurden, und einer Zelllinie aus dem Karpfen wurden der Gesamt-Cytochrom P450-Gehalt, und die Enzymaktivitäten von EROD, ECOD, NCR, GST und PEP-CK untersucht. Hierzu wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, dann homogenisiert und die Enzymaktivitäten im Zellkulturhomogenat (10 000 g Überstand) gemessen. In Induktionsversuchen wurden fast konfluente Kulturen von RTG- und RTH-Zellen für 3 Tage mit verschiedenen Konzentrationen BNF und

BAP inkubiert und der Einfluß auf die Expression von CYP1A1 im Zellkulturhomogenat und in Mikrosomen mit verschiedenen Methoden untersucht.

### 7.3.1 Aktivitäten verschiedener Biotransformationsenzyme in Zelllinien

Der Nachweis von Cytochrom P450, dem Isoenzym CYP1A1 und den 1A1 Enzymaktivitäten EROD und ECOD war in allen 4 untersuchten Fischzelllinien im Gegensatz zu kultivierten Leberzellen aus der Regenbogenforelle nicht möglich (Abb. 7.1).

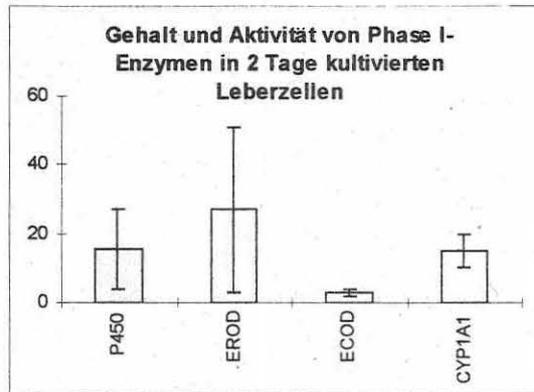


Abb. 7.1: Gehalt und Aktivität von Phase I-Enzymen in 2 Tage kultivierten Leberzellen aus der Regenbogenforelle. Cytochrom P450 (Homogenat, n=7) wurde in pmol/mg Protein, CYP1A1 (Mikrosomen, n=3) in ng/10 µg Protein und EROD/ECOD (Homogenat, n=3/n=5) in pmol/min/mg Protein angegeben. n gibt die Anzahl der Zellisolationen bzw. die Anzahl der Messungen (basierend auf einer Isolation, bei CYP1A1) wieder (Mittelwerte ± Standardabweichung).

Die Enzyme NCR (Elektronendonator für die MFO-katalysierten Oxidationsreaktionen der Phase I) und das Phase II-Konjugationsenzym GST ließen sich dagegen in allen Systemen (Zelllinien und Primärzellen) nachweisen. Als Enzym mit besonderer Bedeutung für den Leberstoffwechsel wurde außerdem die PEP-CK untersucht. Mit Ausnahme der RTH-Zellen war auch dieses Enzym sowohl in Zelllinien wie in Primärzellen nachweisbar. Die gemessenen Aktivitäten wiesen dabei im Homogenat von Leberzellen eine etwas höhere GST- und PEP-CK-Aktivität auf als die Zelllinien. In der epithelialen Karpfen-Zelllinie EPC konnten dagegen höhere NCR-Aktivitäten als in 2 Tage kultivierten Primärzellen beobachten werden (Abb. 7.2).

### 7.3.2 Einfluß von CYP1A1-Induktoren auf die Aktivität von Biotransformationsenzymen in RTG- und RTH-Zellen

Auch nach Applikation der CYP1A1-Induktoren BNF und BAP bis zu Konzentrationen von 500 µM in Kulturen von R1-, RTG-, RTH- und EPC-Zellen ließ sich das 1A1-Isoenzym in keiner der Zelllinien nachweisen. Der Nachweis von CYP1A1 wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt:

- ELISA/Western Blot von Mikrosomen
- Messung der Enzyme ECOD und EROD sowohl im Homogenat als auch in den Mikrosomen.

Auf die Aktivitäten des Phase II-Biotransformationsenzym GST hatte die Inkubation der Zellen mit BAP und BNF keinen signifikanten Einfluß (Abb. 7.3).

## 7. Biotransformationsenzyme in Zelllinien

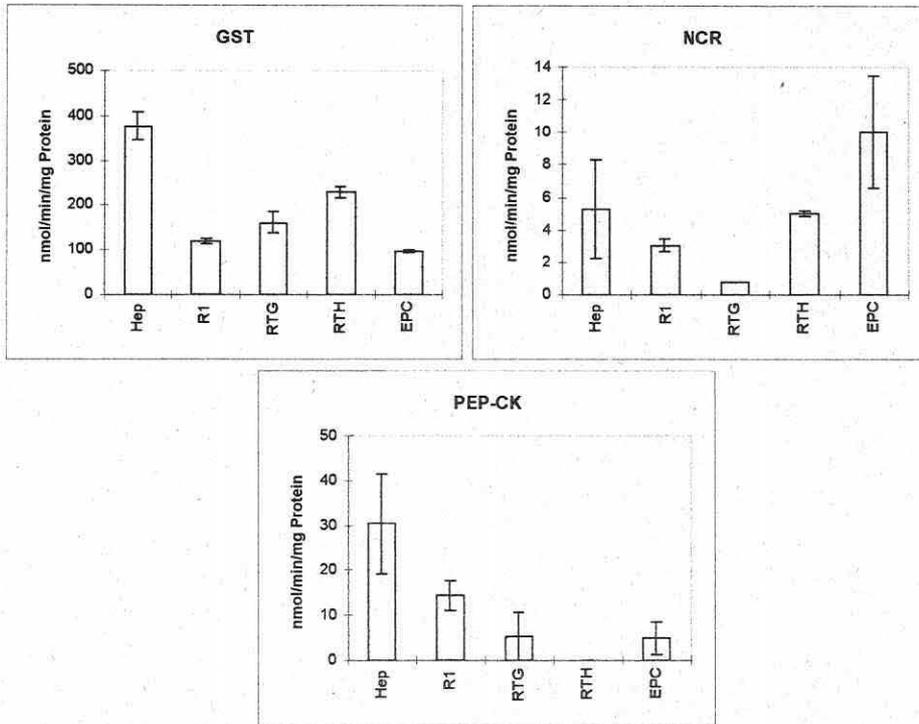


Abb. 7.2: Aktivitäten von GST (Glutathion-S-transferase), NCR (NADPH-Cytochrom c(P450)-Reduktase) und PEP-CK (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) in 2 Tage alten Primärkulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (Hep) und 4 verschiedenen Zelllinien aus der Regenbogenforelle (R1, RTG-2 und RTH-149) und dem Karpfen (EPC). Die Enzymaktivitäten wurden im Zellhomogenat (10 000 g Überstand) gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

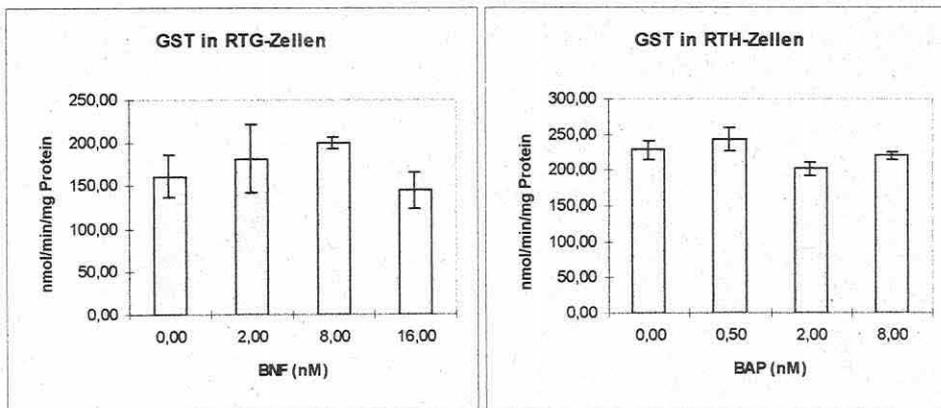


Abb. 7.3: GST-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von BNF ( $\beta$ -Naphthoflavin) und BAP (Benzo(a)pyren). Konfluente Zellen wurden für 3 Tage inkubiert. Meßwerte sind Mittelwerte aus drei 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen  $\pm$  Standardabweichung (n=3).

#### 7.4 Diskussion

Die Untersuchung der Zelllinien R1, RTG-2, RTH-149 und EPC sollte die Frage klären, ob sich diese Zelllinien für Fragestellungen bei der Untersuchung der Biotransformation von Xenobiotica eignen. Aufgrund der leichteren Handhabung und einer besseren Standardisierung wäre die Verwendung von Zelllinien im Vergleich zu Primärzellen von Vorteil. Daher wurden verschiedene Biotransformationsenzyme der Phase I und II und ihre Aktivitäten mit und ohne Induktion durch BAP und BNF untersucht.

Cytochrom P450, CYP1A1 und dessen Enzymaktivitäten EROD und ECOD konnten in keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden 2 Tage alte Primärkulturen von Forellenleberzellen untersucht, in denen sich alle untersuchten Parameter in substantiellen Mengen messen ließen (Abb. 7.1). Auch nach Präparation der Mikrosomenfraktion - in der die Cytochrom P450-Enzyme lokalisiert sind - aus den permanenten Zelllinien konnten sie nicht bestimmt werden. Da Cytochrom P450 und das Isoenzym 1A1 konstitutiv auch *in vivo* oder in Primärzellkulturen nur in relativ kleinen Mengen gebildet werden, CYP1A1 aber durch PAHs induzierbar ist, wurden die Zelllinien mit BNF und BAP bis an die Grenze der Löslichkeit (500 µM) für 3 Tage inkubiert. Auch nach BNF oder BAP waren die untersuchten Phase I Enzyme nicht meßbar. Die fehlende Expression von Phase 1-Biotransformationsenzymen in R1- und RTG-2-Zelllinien bestätigt auch die von (Braunbeck et al., 1995) durchgeführte Untersuchung: Auch bei Konzentrationen von BAP über 50 µM konnte nur eine sehr geringe Toxizität (max. 5-20 % verringerte Kristallviolett-Färbung) in R1 und RTG-Zellen beobachtet werden. Cyclophosphamid zeigte nur bei Zusatz von S9-Mix eine zytotoxische Wirkung auf R1-Zellen (Nachweis über Neutralrot-Aufnahme).

Sowohl die enzymatischen Befunde als auch die Toxizitätsuntersuchungen widersprechen Berichten über die Metabolisierungskapazität von RTG-Zellen (Diamond & Clark, 1970) und der AHH (Arylhydrocarbonhydroxylase) -Induktion in RTH-Zellen (Lorenzen & Okey, 1990):

1. Die von Diamond und Clark publizierten Ergebnisse beziehen sich auf Ergebnisse mit radioaktiv markiertem Benzo(a)pyren. Da diese Nachweismethode sehr sensitiv ist, könnten die in der RTG-Zellen vorhandenen Phase I-Enzyme möglicherweise in so geringen Mengen gebildet werden, daß sie mit spektrophotometrischen, immunologischen und enzymatischen Methoden nicht nachweisbar sind. Auch wurde in der angesprochenen Untersuchung nicht überprüft (z.B. durch Inkubation der Metabolite mit Sulfatasen oder Glucuronidasen, Identifizierung mit Referenzsubstanzen), ob es sich um Metabolite handelt, die durch die Aktivität von CYP1A1 entstanden sein könnten. Auch für Aflatoxin - ein Mycotoxin, daß durch Cytochrom P450 aktiviert wird - ließ sich eine geringfügige Metabolisierung in RTG Zellen demonstrieren (Grasse & Segner, 1995). Untersuchungen mit zwei anderen salmoniden Zelllinien - CHSE-214 und AS-1 - zeigten, daß es sich zumindest bei diesen Zelllinien bei den Metaboliten um hydroxilierte Aflatoxine handelt, so daß eine Beteiligung von Cytochrom P450 wahrscheinlich ist (Chen et al., 1985).

2. Von Lorenzen und Okey wurde die Induktion der AHH (Arylhydrocarbonhydroxylase, für CYP1A1 spezifische Aktivität) in der RTH-Zelle nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte aber mit TCDD, daß die höchste Affinität zum Ah-Rezeptor hat. Mit Benzo(a)pyren wurde nur eine sehr schwache EROD-Induktion gezeigt. Eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve konnte nicht aufgestellt werden. Die Induktion konnte nur mit sehr hohen unter toxikologischem Aspekt irrelevanten Konzentrationen demonstriert werden. Darüber hinaus wurde die Enzymaktivität in intakten Zellen über einen Inkubationszeitraum von 1 h Stunde gemessen. So wurde möglicherweise eine wesentlich höhere Sensitivität erreicht. Wenn man dazu noch die sehr geringen Aktivitäten berücksichtigt (0,1 bis 0,6 pmol/min/mg Protein), so läßt

## 7. Biotransformationsenzyme in Zelllinien

sich die nicht meßbare EROD-Aktivität bzw. -Induktion in dem hier durchgeführten Versuch erklären.

Die Messung einiger anderer Enzyme, die ebenfalls am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind (GST und NCR, siehe Kapitel 6) sowie eines spezifischen Leberenzym (PEP-CK, Kap. 6) zeigte, daß die nicht meßbaren Cytochrom P450-Enzyme nicht Folge einer allgemein verringert Vitalität bzw. physiologischen Leistungsfähigkeit sind. Vielmehr sind die Phase I-Aktivitäten spezifisch verringert, während andere Enzyme mit geringen Unterschieden sowohl in den Zelllinien als auch in den Leberzellen nachweisbar sind (Abb. 7.2). Erstaunlich ist dabei, daß die Aktivitäten dieser Enzyme nicht immer in den Leberzellen am höchsten sind. Dies trifft zwar für GST und PEP-CK, nicht aber für die NCR zu. Dabei ist die NCR-Aktivität in der Epithelzelllinie EPC höher als in der R1-Zelle oder in der RTH-Zelle, obwohl diese aus der Forellenleber stammen und zumindest für die RTH-Zelle die Induktion von CYP1A1 demonstriert wurde. Da die NCR (NADPH-Cytochrom c(P450)-Reduktase) die Elektronen für die Oxidationsreaktion durch P450-Enzyme liefert, überraschen die hohen Aktivitäten, zumal gleichzeitig keine P450-Enzyme nachweisbar waren. Wie schon im Kapitel 6 diskutiert, könnte hier aber die durch KCN nicht effektiv gehemmte mitochondriale NADH-Cytochrom c-Reduktase die Ursache sein. Die als Markerenzym für den Stoffwechsel der Leber gemessene PEP-CK konnte ebenfalls nicht in der Leberhepatomzelle RTH nachgewiesen werden. In der Epithelzelle EPC und in der aus der Gonade isolierten RTG-Zelllinie war diese dagegen in der gleichen Größenordnung wie in der Leberzellkultur meßbar.

Die Aktivität des Phase II-Konjugationsenzym GST war in den Zelllinien in ähnlichen Größenordnung wie in den Leberzellkulturen meßbar. Da zumindest ein Isoenzym der GST unter der Kontrolle des Ah-Rezeptors ist (Bock, 1993), wurde überprüft, ob sich an Stelle der Induktion von CYP1A1 Auswirkungen von PAHs mit Hilfe der GST messen ließen. In Leberzellkulturen war eine Induktion der GST durch die untersuchten PAHs nicht nachweisbar. Als Ursache wurde die Überlagerung der PAH-induzierbaren GST durch andere Isoenzyme diskutiert (siehe Kap. 5). Da in den Zelllinien aber möglicherweise andere Isoenzymmuster als in den Primärzellen etabliert sind, wurde überprüft, ob sich nicht eine Induktion der GST durch PAHs nachweisen ließ. Eine signifikante Änderung der GST Aktivität konnte aber weder mit BNF in RTG-Zellen noch mit BAP in RTH-Zellen nachgewiesen werden.

Die hier gemachten Untersuchungen zeigen, daß - auch wenn vereinzelt Berichte existieren, die auf eine gewisse Kapazität zum Fremdstoffmetabolismus hindeuten - die hier verwendeten Zelllinien nicht geeignet sind eine Induktion von CYP1A1 nachzuweisen. Dies bedeutet, daß die untersuchten Zelllinien nicht für die Charakterisierung von Xenobiotica und den Nachweis einer Belastung mit PAHs durch CYP1A1-Induktion eingesetzt werden können.

Da aber die Verwendung von Zelllinien zur Untersuchung der Induktion von Biotransformationsenzymen von großem Vorteil wäre, kann die Untersuchung weiterer Zelllinien helfen, eine geeignete permanente Zelllinie zu finden. In der Literatur sind einige weitere Zelllinien beschrieben, die in dieser Hinsicht vielversprechend sind, bisher aber nicht kommerziell erhältlich sind:

- Aus der Leber der Regenbogenforelle wurde von Lee et al. (1993) die RTL-W1-Zelllinie isoliert, in der im Gegensatz zu allen bisher aus der Leber der Regenbogenforelle isolierten Zelllinien EROD sowohl durch TCDD als auch durch BNF mit relativ hohen Aktivitäten (TCDD:  $\approx 130$ ; BNF:  $\approx 60$  pmol/min/mg Protein) induziert werden konnte. Die gemessenen Enzymaktivitäten waren dabei den bei Primärzellkulturen gefundenen Werten schon

wesentlich näher (siehe Kap. 5: EROD bis  $\approx 2000$  pmol/min/mg Protein). BNF induzierte EROD in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 nmol, was dem in Kapitel 5 mit Primärzellen untersuchten Konzentrationsbereich entsprach. Auch konnte außer für TCDD auch für BNF eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve angenähert werden.

- Hahn et al. (1993) isolierten eine Zelllinie aus einem Hepatom von *Poecilia reticulata* (PHLC-1). EROD war in ähnlich hohen Aktivitäten wie mit der RTL-W1 Zelle induzierbar. Allerdings wurde nur TCDD untersucht, so daß nicht abgeschätzt werden kann, ob auch andere Induktoren mit geringerer Affinität zum Ah-Rezeptor und niedrigeren maximalen Induktionsantworten eine Induktion von EROD in der PHLC-1-Zelllinie auslösen.

- Von Collodi et al. (1992) wird eine haploide Zelllinie, die aus dem Zebrafischembryo gewonnen wurde, beschrieben, in der nach Exposition mit TCDD CYP1A1 immunologisch nachweisbar war.

Neben der Suche nach geeigneten Zelllinien ist auch eine gezielte Konstruktion von CYP1A1 positiven Zellen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden möglich, wie dies für eine Human- und eine Hamsterzelllinie beschrieben wurde (Crespi, 1993; Doehmer & Oesch, 1991). Für bestimmte Fragestellungen, die die Induktion von CYP1A1 isoliert vom Gesamtstoffwechsel der Zelle betrachten, könnten auch diese Zellen geeignet sein. Darüber hinaus bieten sie die Möglichkeit, durch Kopplung an ein Reportergen auf wesentlich einfachere, genauere und sensitivere Art Auskunft über die Induktion eines Proteins, dessen Synthese an die Bindung eines bestimmten Rezeptors an einen Promotor gekoppelt ist, zu geben.

In der Zukunft besteht daher durchaus die Möglichkeit das eine Reihe von Fragestellungen, die derzeit noch mit Primärzellen bearbeitet werden müssen, auch zufriedenstellend mit permanenten Zelllinien untersucht werden könnte und so ggf. eine Anwendung für Routineuntersuchungen möglich würde.

## 8. Abschlußbemerkungen

Zelluläre *in vitro*-Systeme können in verschiedener Art und Weise beim Nachweis einer Belastung von Umweltproben, bei der Aufklärung von Wirkungsmechanismen, bei Toxizitätsuntersuchungen und bei der Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen eingesetzt werden. Je nachdem, welche Effekte von Fremdstoffen auf Zellen untersucht werden und welche spezifischen Mechanismen zur Entstehung dieser Effekte beitragen, können permanente oder primäre Zellkulturen für diese Untersuchungen verwendet werden. Während permanente Zelllinien in der praktischen Durchführbarkeit und bei der Etablierung standardisierter, reproduzierbarer Versuchsbedingungen einen großen Vorteil bieten, fehlen ihnen im Gegensatz zu geeigneten Primärkulturen häufig bestimmte biochemische Charakteristika, die Voraussetzung für die Entstehung spezifischer (toxischer) Effekte sind. Auf der anderen Seite zeichnen sich Primärkulturen aufgrund der individuellen Variation der Tiere, aus denen die Zellen isoliert wurden, durch relative hohe Schwankungen physiologischer und biochemischer Parameter aus.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein zelluläres System zum Nachweis der durch Xenobiotica ausgelösten Induktion des Cytochrom P450-Isoenzym 1A1 in Fischen entwickelt. Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion in Fischzellen sind bisher nur vereinzelt durchgeführt worden. Insbesondere fehlen bislang eine umfangreiche biochemische Charakterisierung sowie der Vergleich der induzierenden Wirkung verschiedener polyaromatischer Kohlenwasserstoffe und die Aufstellung von Konzentrations-Wirkungskurven in Primärzellkulturen von Fischhepatozyten.

Die wichtigsten Ergebnisse aus dieser Arbeit sollen hier kurz zusammengefaßt werden:

- Zum Nachweis der CYP1A1-Induktion wurde ein immunologisches Nachweissystem entwickelt, das zusätzlich zum enzymatischen Nachweis von CYP1A1 eingesetzt werden kann (Kapitel 3). Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CYP1A1 aus der Regenbogenforelle hergestellt. Dieser ermöglichte den direkten Nachweis der Induktion der CYP1A1-Proteinsynthese in  $\beta$ -Naphthoflavon-inkubierten Primärkulturen von Forellenhepatozyten. Sowohl durch enzymatischen Nachweis mit EROD (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase) als auch durch die immunochemische Detektion im ELISA und im Western Blot konnte eine Induktion von CYP1A1 nachgewiesen werden. Ein Vorteil der immunochemischen Nachweismethoden könnte insbesondere in der Untersuchung von Xenobiotica bestehen, die bei gleichzeitiger Induktion von CYP1A1 dessen Enzymaktivität hemmen (z.B. bestimmte PCB-Kongeneren).

- Die Aussagekraft von Leberzellen in Primärkultur aus Säugern ist häufig dadurch limitiert, daß bereits in den ersten Stunden nach der Isolierung ein substantieller Verlust von Cytochrom P450 und seinen Isoenzymen auftritt. Ein signifikanter Verlust des Gesamt-Cytochrom P450-Gehalts - quantifiziert mit Hilfe von CO-Differenzspektren - konnte auch in Forellenhepatozyten festgestellt werden. Das PAH-induzierbare CYP1A1-Isoenzym zeigte dagegen in Forellenhepatozyten eine mit fortgeschrittener Kulturdauer gesteigerte Aktivität. Durch Kokultur der Hepatozyten mit der RTG- oder der RTH-Zelllinie konnte eine erhöhte Aktivität des CYP1A1-Isoenzym gegenüber nicht kokultivierten Hepatozyten festgestellt werden. Der Zusatz von Hormonen und Kofaktoren, die Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen aber vor allem die Kokultur mit verschiedenen Zelllinien zeigten außerdem eine signifikant erhöhte Vitalität und Zellanheftung gegenüber reinen Hepatozytenkulturen (Kapitel 4). Offenbar wird durch die Kokultur mit anderen Zellen, die Beschichtung mit Collagen und der Zusatz verschiedener hormoneller Stimuli und Cofaktoren für die Hepato-

zyten eine Mikroumgebung geschaffen, die der *in vivo*-Situation der Leber näher ist und zu einer Stabilisierung von Vitalität und biochemischen Charakteristika führt.

- Aufbauend auf den Ergebnissen zur Optimierung der Kulturbedingungen wurden die im Kapitel 5 dargestellten Untersuchungen zur Induktion von CYP1A1 durch  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF), Benzo(a)pyren (BAP), Benzanthracen (BAT) und Methylcholanthren (MC) in Kokulturen von Hepatozyten mit RTG-2 Zellen durchgeführt. Wie auch bereits im Kapitel 4 wurden zwischen den einzelnen Zellisolierungen relativ große individuelle Schwankungen festgestellt. Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für BNF, BAP, BAT und MC zeigten bezüglich der EROD-Aktivität in ihrer Rangfolge eine Übereinstimmung mit der Ah-Rezeptoraffinität im Zytosol der Rattenleber. Diese Übereinstimmung sowie der Vergleich mit Lipophilie-Daten deutete darauf hin, daß nicht nur die Aufnahme der Stoffe über die Zellmembran und ihre Bioakkumulation in der Zelle bei der Induktion von CYP1A1 eine untergeordnete Rolle spielte, sondern das offensichtlich die Rezeptoraffinität für die Induktion von CYP1A1 wesentlich ist. Zugleich deutete die Übereinstimmung zwischen Ah-Rezeptor-Affinität und CYP1A1-Induktion an, daß bezüglich der hier untersuchten Substanzen keine prinzipiellen Unterschiede zwischen Säugern und Fischen bestanden. Die unterschiedlichen maximalen Induktionsantworten wurden als Folgen einer sterischen Behinderung der mRNA durch den Substrat-Rezeptor-DNA-Komplex diskutiert. Neben der Möglichkeit der Aufstellung von Konzentrations-Wirkungskurven für die CYP1A1-Induktion in Forellenhepatozyten wurde außerdem demonstriert, daß sich dieses Primärzellkultursystem auch zum Nachweis der Belastung einer Umweltprobe mit Polyaromaten eignet.

- Die beiden Fischarten Forelle (*Oncorhynchus mykiss*) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) zeigten sowohl Gemeinsamkeiten als auch einige Unterschiede in einer Reihe von enzymatischen Kenndaten (Kapitel 6). Insbesondere Unterschiede zwischen den pH-Optima der CYP1A1 Enzymaktivitäten ECOD und EROD konnten festgestellt werden. Beim Vergleich von Primärkulturen mit Leberzellkulturen beider Spezies konnte eine entgegengesetzte Entwicklung der CYP1A1-Enzymaktivitäten beobachtet werden. Diese beobachteten Unterschiede müssen bei der Extrapolation der mit einer Spezies gefundenen Ergebnisse berücksichtigt werden.

- Die Fischzelllinien RTG-2, RTH-149 und R1 aus der Regenbogenforelle sowie die Karpfen-Epithelzelllinie EPC eigneten sich nicht zum Nachweis einer CYP1A1-Induktion (Kapitel 7). Sowohl konstitutiv als auch nach Exposition in  $\beta$ -Naphthoflavon oder Benzo(a)pyren konnte weder enzymatisch noch immunologisch CYP1A1 nachgewiesen werden.

Die Induktion von CYP1A1 ist ein wichtiger Parameter bei der Beurteilung der Schadwirkung verschiedener Xenobiotica, insbesondere polyaromatischer (chlorierter) Kohlenwasserstoffe. Ihre Metabolisierung über das CYP1A1-Isoenzym kann sowohl Einfluß auf ihre Toxizität (Aktivierung oder Detoxifizierung) als auch auf ihre Bioakkumulation (verstärkte Metabolisierung und Exkretion nach CYP1A1-Induktion) haben. Die hier vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß sich Primärzellkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle prinzipiell zur Charakterisierung der Induktionseigenschaften von PAHs und anderen CYP1A1-Induktoren eignen. Bei Ausdehnung der durchgeführten Konzentrations-Wirkungs-Untersuchungen auf weitere Substanzen ist die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen möglich.

Die Übereinstimmung zwischen Säuger- und Fischsystem bei Ah-Rezeptor-Affinität und CYP1A1-Induktion deutet daraufhin, daß zumindest bezüglich der untersuchten Substanzen zwischen diesen Tierklassen keine prinzipiellen Unterschiede bei der CYP1A1 Induktion bestehen. Die Charakterisierung der Induktionskapazität von aromatischen Kohlenwasser-

## *8. Abschlußbemerkungen*

stoffen in einem der Systeme könnte daher u.U. eine allgemeine, Spezies- und Tierklassen-übergreifende Aussagekraft besitzen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Kultur von Forellenhepatozyten ein geeignetes System zur Charakterisierung von Fremdstoffen darstellt. Diese Eigenschaft, aber auch weitere Möglichkeiten der Charakterisierung von Schadstoffen mit Forellenhepatozyten wie z.B. der Induktion der Vitellogeninsynthese durch östrogene Umweltchemikalien (Pelissero et al., 1993) öffnen ein breites Feld für zukünftige Anwendungen in der aquatischen Toxikologie.

## 9. Literatur

- Achazi, R.K., Chroszcz, G., Heimig, E., Neunaber, R. and Steudel, I. A high-molecular regulator of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in fish (1994). *Comp. Biochem. Physiol. C* 108, 243-256.
- Ahne, W. Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für Toxizitätsbestimmungen zur Einschränkung und als Ersatz des Fischtests (1985). *Zentr. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* 180, 480-504.
- Andersson, T., Pesonen, P. and Johanson, C. Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by  $\beta$ -Naphthoflavone or Clophen A50 (1985). *Biochem. Pharmacol.* 34, 3309-3314.
- Arinc, E. (1995). General aspects of NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. In: *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolism Enzymes: NATO ASO Series H*, hrsg. von E. Arinc, J.B. Schenkman and E. Hodgson, Vol. 90., Springer-Verlag, Berlin, S. 23-45.
- Babich, H., Borenfreund, E. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review (1991). *Toxicol. in Vitro* 5, 91-100.
- Begue, J.-M., Guguen-Guillouzo, C., Pasdaloop, N. and Guillouzo, A. Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type (1984). *Hepatology* 4, 839-842.
- Behn, I., Fiebig, H. Herstellung monoklonaler Antikörper durch Lymphozytenhybridomtechnik (1984). *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R.* 33, 612-618.
- Behn, I., Gruhn, R. and Fiebig, H. Herstellung von monoklonalen Antikörpern zur Bestimmung von Human-IgM (1984). *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R.* 33, 641-644.
- Bend, J.R., James, M.O. (1978). Xenobiotic metabolism in marine and freshwater species. In: *Biochemical and biophysical perspectives in Marine Biology*, hrsg. von D.C. Malins, J.A. Sargent, Vol. 4., Academic Press, New York, S. 125-188.
- Beresford, A.P. CYP1A1: Friend or foe? (1993). *Drug Metab. Rev.* 25, 503-517.
- Bissel, D.M., Arenson, D.M., Maher, J.J. and Roll, F.J. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver (1987). *J. Clin. Invest.* 79, 801-812.
- Blaauboer, B.J., Boobis, A.R., Castell, J.V., Coecke, S., Groothuis, G.M.M., Guillouzo, A., Hall, T.J., Hawksworth, G.M., Lorenzon, G., Mittenburger, H.G., Rogiers, V., Skett, P., Villa, P. and Wiebel, F.J. The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing (1994). *ATLA* 22, 231-241.
- Blair, J.B., Miller, R.M., Pack, D., Barnes, R., Teh, S.J. and Hinton, D.E. Isolated Trout Liver Cells: Establishing Short-Term Primary Cultures Exhibiting Cell-to-cell Interactions (1990). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 26, 237-249.
- Bock, K.W. (1993). Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, hrsg. von M.P. Blaustein, H. Grunicke, E. Habermann, D. Pette, H. Reuter, B. Sakmann, M. Schweiger, E.R. Weibel and E.M. Wright, Vol. 125., Springer-Verlag, Berlin, S. 1-42.
- Boon, J.P., Everaats, J.M., Hillebrand, M.T.J., Eggens, M.L., Pijnenburg, J. and Goksøyr, A. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40) (1992). *Sci. Tot. Environ.* 114, 113-133.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braunbeck, T. Cytological Alterations in Isolated Hepatocytes from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed *In vitro* to 4-Chloroaniline (1993). *Aqu. Toxicol.* 25, 83-110.
- Braunbeck, T., Voelkl, A. Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-o-cresol: an ultrastructural and biochemical study (1991). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 109-27, 1991.
- Braunbeck, T., Hauck, C., Scholz, S. and Segner, H. Mixed function oxygenases in cultured fish cells: contribution of *in vitro* studies to the understanding of MFO induction (1995). *Angew. Zoologie* 1/95, im Druck.
- Burchell, B., Coughtrie, M.W.H. UDP-Glucuronosyltransferases (1989). *Pharmac. Ther.* 43, 261-289.
- Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., Coloma, J. and Lopez, P. Preservation of the adult functionality of hepatocytes in serum-free cultures (1983). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 333-336.
- Castren, M., Oikari, A. Optimal assay conditions for liver UDP-Glucuronosyltransferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri* (1983). *Comp. Biochem. Physiol.* 76, 365-369.
- Celander, M., Förlin, L. Catalytic activities and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in  $\beta$ -Naphthoflavon treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (1991). *Fish Physiol. Biochem.* 9, 189-197.
- Chen, S.-C.G., Lin, C.-H. and Cheng, M.-C. Action of carcinogenic mycotoxin AFB1 on cultured cells of salmonid species (1985). *J. Chin. Biochem. Soc.* 14, 28-38.
- Chenery, R.J. (1987). Metabolism and toxicity of drugs in mammalian hepatocyte culture. In: *In vitro methods in toxicology*, hrsg. von C.K. Atterwill et al., Cambridge, S. 211-233.
- Clément, B., Guguen-Guillouzo, C., Campion, J.-P., Glaise, D. and Guillouzo, A. Long-Term Co-Cultures of Adult Human Hepatocytes with Rat Liver Epithelial Cells: Modulation of Albumin Secretion and Accumulation of Extracellular Material (1984). *Hepatology* 4, 373-380.
- Collier, T.K., Varanasi, U. Hepatic Activities of Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Biliary Levels of Xenobiotics in English Sole (*Parophrys vetulus*) Exposed to Environmental Contaminants (1991). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 462-473.
- Collier, T.K., Connor, S.D., Eberhart, B.T.L., Anulacion, B.F., Goksøyr, A. and Varanasi, U. Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: initial results from regional and national surveys (1992). *Mar. Environ. Res.* 34, 195-9, 1992.
- Collodi, P., Kamei, Y., Ernst, T., Miranda, C.L., Buhler, D.R. and Barnes, D.W. Culture of cells from zebrafish

## 9. Literatur

- (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues (1992). Cell. Biol. Toxicol. 8, 43-61.
- Crespi, C.L. (1993). Human cell lines engineered to stably express human cytochrome P450s; utilization to determine the roles of individual enzymes in toxicity and mutagenicity. In: FEBS Meeting Stockholm 1993, Abstract Book, herausgegeben von FEBS, S. 37.
- de Bruijn, J.H.M., Seinen, W. and Hermens, J. Biotransformation of organophosphorus compounds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver in relation to bioconcentration (1993). Environ. Toxicol. Chem. 12, 1041-1050.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates (1994). Ecotoxicology 3, 161-172.
- Devaux, A., Monod, G., Masfaraud, J.-F. and Vaillant, C. Use of a New Coumarin Analog in the Study of Cytochrome P-450 Dependent Monooxygenase Activities in Primary Culture of Rainbow Trout Hepatocytes *Oncorhynchus mykiss* (1991). C. R. Acad. Sci. Paris 312, 63-69.
- Devaux, A., Pesonen, M., Monod, G. and Andersson, T. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes (1992). Biochem. Pharmacol. 43, 898-901.
- de Wolf, W. (1992): Influence of biotransformation on the bioconcentration of chemicals. Ph.D. Dissertation, University of Utrecht. 150 S.
- Diamond, L., Clark, H.F. Comparative studies on the interaction of benzo(a)pyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I. Metabolism of benzo(a)pyrene (1970). J. Nat. Cancer Inst. 45, 1005-1011.
- Doehmer, J., Oesch, F. V79 chinese hamster cells genetically engineered for stable expression of cytochromes P450 (1991). Methods Enzym. 206, 147-167.
- Donato, M.T., Castell, J.V. and Gomez-Lechon, M.J. Prolonged Expression of Biotransformation Activities of Rat Hepatocytes Co-Cultured with Established Cell Lines (1990). Toxicol. in Vitro 4, 461-466.
- Donato, M.T., Castell, J.V. and Gomez-Lechon, M.J. Co-Cultures of Hepatocytes with Epithelial-Like Cell Lines: Expression of Drug-Biotransformation Activities by Hepatocytes (1991). Cell. Biol. Toxicol. 7, 1-14.
- Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J. and Castell, J.V. The CytoFluor 2350 Fluorescence measurement system. A microassay for measuring cytochrome p450IA1 and P450IIB1 activities in intact hepatocytes (1992). Millipore Technical Brief.
- Elskus, A.A., Pruell, R. and Stegeman, J.J. Endogenously-mediated, pretranslational suppression of cytochrome P450IA1 in PCB-contaminated flounder (1992). Mar. Environ. Res 34, 97-101.
- Ernst, W.H.O., Peterson, P.J. The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants (1994). Ecotoxicology 3, 180-192.
- Flouriot, G., Vaillant, C., Salbert, G., Pelissero, C., Guiraud, J.M. and Valotaire, Y. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates (1993). J. Cell Science 105, 407-416.
- Förlin, L., Celander, M. Induction of cytochrome P450 1A in teleosts: environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters (1993). Aqu. Toxicol. 26, 41-56.
- Förlin, L., Haux, C. Increased excretion in the bile of 17 $\beta$ -(3H)estradiol-derived radioactivity in rainbow trout treated with  $\beta$ -naphthoflavon (1985). Aqu. Toxicol. 6, 197-208.
- Förlin, L., Balk, L., Celander, M., Bergek, S., Hjelt, M., Rappe, R., de Wit, C. and Jansson, B. Biotransformation enzyme activities and PCDD/PCDF levels in pike caught in a swedish lake (1992). Mar. Environ. Res. 34, 169-173.
- Franklin, R.B., Elcombe, C.B., Vodnick, M.J. and Lech, J.J. (1980). Comparative Aspects of Hepatic Monooxygenase Induction in Rat and Rainbow Trout by Several PCB Isomers. In: Microsomes, Drug Oxidations, and Chemical Carcinogenesis, edited by M.I. Coon et al., Academic Press, Inc., New York, S. 833-835.
- Fry, J.R. Activation Systems in Tissue Culture Toxicity Studies (1982). Toxicology 25, 1-12.
- Fryer, J.L., McCain, B.B. and Leong, J.C. A cell line derived from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) hepatoma (1981). Fish Pathology 15, 193-200.
- Gillner, M., Bergman, J., Cambilau, C., Fernström, B. and Gustafsson, J.-A. Interactions of indoles with binding sites for 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in rat liver (1985). Molecul. Pharmacol. 28, 357-363.
- Goksøyr, A. A Semi-Quantitative Cytochrome P450IA1 ELISA: A Simple Method for Studying the Monooxygenase Induction Response in Environmental Monitoring and Ecotoxicological Testing of Fish (1991). Sci. Tot. Environ. 101, 255-262.
- Goksøyr, A., Förlin, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring (1992). Aqu. Toxicol. 22, 287-311.
- Goksøyr, A., Husoy, A.-M. The cytochrome P450 1A1 response in fish: application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing (1993). Mar. Environ. Res. 34, 147-150.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsoyr, J., Zhang, Y. and Förlin, L. Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) (1987). Toxicol. Appl. Pharmacol. 89, 347-360.
- Goksøyr, A., Serigstad, B., Solberg, T.S. and Stegeman, J.J. Response of Cod (*Gadus Morhua*) Larvae and Juveniles to Oil Exposure Detected with Anti-cod Cytochrome P-450c IgG and Anti-scup Cytochrome P-450E MAb 1-12-3 (1988). Mar. Environ. Res 24, 31-35.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D.E. and Förlin, L. Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P450IA) in liver microsomes from different fish species and rat (1991a). Fish Physiol. Biochem. 9, 1-13.
- Goksøyr, A., Larsen, H.E. and Husoy, A.M. Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish (1991b). Comp. Biochem. Physiol. C 100, 157-160.
- Goldstein, J.A., Faletto, M.B. Advances in mechanism of activation and deactivation of environmental chemicals (1993). Environ. Health Persp. 100, 169-176.

- Gooch, J.W., Elskus, A.A., Kloepper-Sams, P.J., Hahn, M.E. and Stegeman, J.J. Effects of ortho- and Non-ortho-Substituted Polychlorinated Biphenyl Congeners on the Hepatic Monooxygenase System in Scup (*Stenothomus chrysops*) (1989). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 96, 422-433.
- Grasse, C., Segner, H. (1995): Nachweis der Metabolisierung von Aflatoxinen in der RTG-2 Zelllinie mit Dünnschichtchromatographie. Unveröffentlichte Untersuchung, durchgeführt im Labor Zelltoxikologie, UFZ Leipzig-Halle GmbH.
- Gregus, Z., Watkins, J.B., Thompson, T.N., Harvey, M.J., Rozman, K. and Klaassen, C.D. Hepatic phase I and phase II biotransformations in Quail and Trout: comparison to other species commonly used in toxicity testing (1983). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67, 430-441.
- Guery, C., Stepniewski, J.P., Vannier, N., Fournex, R. and Lorenzon, G. Long-term culture of rat hepatocytes on porous membranes in hormonally defined serum-free medium (1993). *Toxicol. in Vitro* 7, 453-459.
- Guguen-Guillouzo, C. (1986). Role of Homotypic and Heterotypic Cell Interactions in Expression of Specific Functions by Cultured Hepatocytes. In: Research in Isolated and Cultured Hepatocytes, hrsg. von A. Guillouzo, C. Guguen-Guillouzo, John Libbey Eurotext Ltd./INSERM, .
- Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A. Recent progresses on long-term hepatocyte primary cultures: importance of cell microenvironments (1993). *Cytotechnology* 11, S3-5.
- Guguen-Guillouzo, C., Goullouzo, A. Modulation of Functional Activities in Cultured Rat Hepatocytes (1983). *Molecul. Cell Biochem.* 53/54, 35-56.
- Guguen-Guillouzo, C., Seignoux, D., Courtois, Y., Brissot, I., Marceau, M., Glaise, D. and Guillouzo, A. Amplified Phenotypic Changes in Adult Rat and Baboon Hepatocytes Cultured on a Complex Biomatrix (1982). *Biol. Cell* 46, 11-20.
- Guguen-Guillouzo, C., Clément, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D. and Guillouzo, A. Maintenance and Reversibility of Active Albumin Secretion by Adult Rat Hepatocytes Co-cultured with another Liver Epithelial Cell Type (1983). *Exp. Cell Res.* 143, 47-54.
- Haasch, M.L., Prince, R., Wejksnora, P.J., Cooper, K.R. and Lech, J.J. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (Cyp1A1) as an environmental biomonitor (1993a). *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 885-95, 1993.
- Haasch, M.L., Quardokus, E.M., Sutherland, L.A., Goodrich, M.S. and Lech, J.J. Hepatic CYP1A1 Induction in Rainbow Trout by Continuous Flowthrough Exposure to  $\beta$ -Naphthoflavone (1993b). *Fund. Appl. Toxicol.* 20, 72-82.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M. and Stegeman, J.J. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1) (1993). *Aqu. Toxicol.* 26, 185-208.
- Hanninen, O., Lindström-Seppä, P., Pesonen, M. and Huuskonen, S. Rainbow trout and its hepatocytes as experimental models (1991). *Dtw (Deutsche Tierärztliche Wochenschrift)* 98, 429.
- Hansch, C., Zhang, L. Quantitative structure-activity relationships of cytochrome P-450 (1993). *Drug Metab. Rev.* 25, 1-48.
- Hauck, C. (1993): Biochemische und morphologische Untersuchungen an isolierten Fischzellen. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, 192 S.
- Heilmann, L.J., Sheen, Y.Y., Bigelow, S.W. and Nebert, D.W. Trout P450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance (1988). *DNA* 7, 379-387.
- Hermens, J.L.M., Bradbury, S.P. and Broderius, S.J. Influence of cytochrome P450 mixed-function oxidase induction on the acute toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of primary aromatic amines (1990). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 20, 156-166.
- Hightower, L.E., Renfro, J.L. Recent applications of fish cell culture to biomedical research (1988). *J. Exp. Zool.* 248, 290-302.
- Holme, J.A., Soderlund, E. and Dybing, E. Drug Metabolism Activities of Isolated Rat Hepatocytes in Monolayer Culture (1983). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 52, 348-356.
- Ingelman-Sundberg, M. Bioactivation or Inactivation of Toxic Compounds (1980). *TIPS March/80*, 176-179.
- Ioannides, C., Parke, D.V. Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis (1993). *Drug Metab. Rev.* 25, 485-501.
- James, M.O., Heard, C.S. and Hawkins, W.E. Effect of 3-methylcholanthrene on monooxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activities in small estuarine and freshwater fish (1988). *Aqu. Toxicol.* 12, 1-15.
- Johnson, B.T. Rainbow trout liver activation systems with the Ames mutagenicity test (1990). *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1183-1192.
- Johnson-Wint, B., Hollis, L.W. A rapid in situ deoxyribonucleic acid assay for determining cell number in culture and tissue (1982). *Anal. Biochem.* 122, 338-344.
- Kaneko, Y., Igarashi, M., Iwashita, M., Suzuki, K., Kojima, H., Kimura, S. and Hasobe, M. Effects of fish and calf type 1 collagens as culture substrate in the adhesion and spreading process of established fish cells (1995). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31, 178-182.
- Kennedy, C.J. (1994). Xenobiotics: designing an *in vitro* system to study enzyme and metabolism. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, hrsg. von P.W. Hochachka, T.P. Mommsen, Vol. 3., Elsevier, Amsterdam, S. 418-430.
- Kennedy, S.W., Lorenzen, A. and James, C.A. A rapid and sensitive cell culture bioassay for measuring ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in cultured hepatocytes exposed to halogenated aromatic hydrocarbons extracted from wild bird eggs (1993). *Chemosphere* 27, 367-373.
- Klaunig, J.K. (1986?). Establishment of Fish Hepatocyte Culture for Use in *In Vitro* Carcinogenicity Studies. In: *National Cancer Institute Monograph No. 65, Use of Small Fish in Carcinogenicity Testing*, Vol. 65, .
- Kleinow, K.M., Melancon, M.J. and Lech, J.J. Biotransformation and induction: Implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish (1987). *Environ. Health Persp.* 71, 105-120.
- Kleinow, K.M., Haasch, M.L., Williams, D.E. and Lech, J.J. A comparison of hepatic P450 induction in rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*): delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers (1990). *Comp. Biochem. Physiol. C* 96, 259-270.

## 9. Literatur

- Kocal, T., Quinn, B.A., Smith, I.R., Ferguson, W. and Hayes, M.A. Use of Trout Serum to Prepare Primary Attached Monolayer Cultures of Hepatocytes from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) (1988). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 24, 304-308.
- Köhler, W., Schachtel, G. and Voleske, P. (1992): *Biostatistik*. Springer-Verlag, Berlin. 255 Seiten. S. 96-97.
- Koymanns, L., Donné-op den Kelder, G.M., Koeppel Te, J.M. and Vermeulen, N.P.E. Cytochromes P450: their active-site structure and mechanism of oxidation (1993). *Drug Metab. Rev.* 25, 325-387.
- Kuri-Harcuch, W., Mendoza-Figueroa, T. Cultivation of Adult Rat Hepatocytes on 3T3 Cells: Expression of Various Liver Differentiated Functions (1989). *Differentiation* 41, 148-157.
- Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. Comparison of testing acute toxicity an embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test (1995). *Chemosphere* 30, 2067-2102.
- Lange, U., Goksøyr, A., Stagg, R., Danischewski, D., Siebers, D., Buchholz, F. and Karbe, L. Abiotic and biotic factors influencing the natural variation of the cytochrome P450 enzyme system in the liver of dab (*Limanda limanda*): An interim report (1994). *Berichte Zentr. Meeres- u. Klimaforsch. Hamburg Reihe E* 7, 57-64.
- Lannan, C.N., Winton, J.R. and Fryer, J.L. New Cell Lines: Fish Cell Lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids (1984). *In Vitro* 20, 671-676.
- Leaver, M.J., Burke, M.D., George, S.G., Davies, J.M. and Raffaelli, D. Induction of cytochrome P-450 monooxygenase activities in plaice by 'model' inducers and drilling muds (1988). *Mar. Environ. Res.* 24, 27-30.
- Lech, J.J., Bend, J.R. Relationship between Biotransformation and the Toxicity and Fate of Xenobiotic Chemicals in Fish (1980). *Environ. Health Persp.* 34, 115-131.
- Lech, J.J., Vodnick, M.J. (1984). Biotransformation. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, edited by G.M. Rand, S.R. Petrocelli, Taylor & Francis, London, S. 526-557.
- Lee, L.E.J., Clemons, J.H., Bechtel, G.B., Caldwell, S.J., Han, K.-B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D.D. and Bols, N.C. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity (1993). *Aqu. Toxicol.* 9, 279-294.
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carriere, S., Narbonne, J.F., Lafaurie, M. and Giudicelli, J. Hepatic Biotransformation Enzymes in Aquaculture European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) - Kinetic Parameters and Induction with Benzo(a)pyrene (1992a). *Comparative Biochemistry and Physiology B - Comparative Biochemistry* 103, 847-853.
- Lemaire, P., Mathieu, A., Giudicelli, J. and Lafaurie, M. Effect of Diet on the Response of Hepatic Biotransformation Enzymes to Benzo(a)pyrene in the European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* (1992b). *Comp. Biochem. Physiol. C* 102, 413-420.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P. Interactive Effects of Cadmium and Benzo(a)pyrene on Cellular Structure and Biotransformation Enzymes of the Liver of the European Eel *Anguilla anguilla* (1992). *Aqu. Toxicol.* 22, 145-160.
- Lenz, D., Segner, H. and Hanke, W. (1993). Comparison of different endpoint methods for acute cytotoxicity tests with the R1-cell line. In: *Fish Ecotoxicology and Physiology*, hrsg. von T.H. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner, VCH, Weinheim, S. 93-102.
- Li, A.P., Barker, J., Beck, D., Colburin, S., Monsell, R. and Pellegrin, C. Culturing of primary hepatocytes as entrapped aggregates in a packed bed bioreactor: A potential bioartificial liver (1993). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 29A, 249-254.
- Lindsay, C., Chenery, R.J. and Hawksworth, G.M. Primary culture of rat hepatocytes in the presence of dimethyl sulphoxide; a system to investigate the regulation of cytochrome P450 IA (1991). *Biochem. Pharmacol.* 42, S17-S25.
- Lindström-Seppä, P., Huuskonen, S., Pesonen, M., Muona, P. and Hänninen, O. Unbleached pulp mill effluents effect cytochrome P450 monooxygenase enzyme activities (1993). *Mar. Environ. Res.* 34, 157-161.
- Lindström-Seppä P., Korytko, P.J., Hahn, M.E. and Stegeman, J.J. Uptake of waterborne 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and organ and cell-specific induction of cytochrome P450IA in adult and larval fathead minnow *Pimephales promelas* (1994). *Aqu. Toxicol.* 28, 147-167.
- Lipsky, M., Sheridan, T.R., Benett, R. and May, B.E. Comparison of Trout Hepatocyte Culture on Different Substrates (1986). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 22, 360-362.
- Littlefield, D.W. Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants (1964). *Science* 145, 709-710.
- Lorenzen, A., Okey, A.B. Detection and characterization of (3H)2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin binding to Ah receptor in a rainbow trout hepatoma cell line (1990). *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 106, 53-62.
- Mannervik, B., Danielson, U.H. Glutathione transferases - structure and catalytic activity (1988). *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- Marquardt, H., Schäfer, S.G. (Hrsg.) (1994a): *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim. 1004 Seiten. S. 455.
- Marquardt, H., Schäfer, S.G. (Hrsg.) (1994b): *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim. 1004 Seiten. S. 780-788.
- Masfaraud, J.F., Devaux, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Malaveille, C. and Monod, G. DNA Adduct Formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase Induction in Primary Culture of Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Benzo(a)pyrene (1992a). *Toxicol. in Vitro* 6, 523-531.
- Masfaraud, J.F., Pfohl, L.A., Malaveille, C., Keith, G. and Monod, G. 7-Ethylresorufin O-deethylase activity and level of DNA-adducts in trout treated with benzo(a)pyrene (1992b). *Mar. Environ. Res.* 34, 351-4, 1992.
- Miller, M.R., Saito, N., Blair, J.B. and Hinton, D.E. Acetaminophen toxicity in cultured trout liver cells. II. Maintenance of cytochrome P450 1A1 (1993a). *Exp. Mol. Pathol.* 58, 127-138.
- Miller, R.M., Wentz, E., Blair, J.B., Pack, D. and Hinton, D.E. Acetaminophen toxicity in cultured trout liver cells. I. Morphological alterations and effects on cytochrome P450 1A1 (1993b). *Exp. Mol. Pathol.* 58, 127-138.
- Miller, R.M., Hinton, D.E. and Blair, J.B. Characterization of BNF-Inducible Cytochrome P-450IA1 in Cultures of Rainbow Trout Liver Cells (1989). *Mar. Environ. Res.* 28, 105-108.

- Mommsen, T.P., French, C.F. and Hochachka, P.W. Sites and patterns of amino acid utilization during spawning migration of salmon (1980). *Can. J. Zool.* 58, 1785-1799.
- Mommsen, T.P., Moon, T.W. and Walsh, P.J. (1994). Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, edited by P.W. Hochachka, T.P. Mommsen, Vol. 3., Elsevier, Amsterdam, S. 356-373.
- Monod, G., Devaux, A. and Riviere, J.L. Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhone (France) (1988). *Sci. Tot. Environ.* 73, 189-202.
- Moon, T.W., Walsh, P.J. and Mommsen, T.P. Fish Hepatocytes: A model metabolic system (1985). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1772-1782.
- Myers, C.R., Sutherland, L.A., Haasch, M.L. and Lech, J.J. Antibodies to a synthetic peptide that react specifically with rainbow trout hepatic cytochrome P450 1A1 (1993). *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1619-1626.
- Neff, J.M. (1984). Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, edited by G.M. Rand, S.R. Petrocelli, Taylor & Francis, London, pp. 416-454.
- Niemann, C., Gauthier, J.-C., Richert, L., Ivanov, M.-A., Melcion, C. and Cordier, A. Rat adult hepatocytes in primary pure and mixed monolayer culture (1991). *Biochem. Pharmacol.* 42, 373-379.
- Okey, A.B., Bondy, G.P., Mason, G., Dahl, G.G., Eisen, H.J., Guenther, T.M. and Nebert, D.W. Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer receptor complex and evidence for its nuclear translocation (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 11636-11648.
- Omura, T., Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilisation, Purification and Properties (1964). *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2386.
- Otto, D.M.E., Lindström-Seppä, P. and Sen, C.K. Cytochrome P450-dependent enzymes and oxidant-mediated responses in rainbow trout exposed to contaminated sediments (1994). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 27, 265-280.
- Paine, A.J., Hockin, L.J. and Allen, C.M. Long Term Maintenance and Induction of Cytochrome P-450 in Rat Liver Cell Cultures (1982). *Biochem. Pharmacol.* 31, 1175.
- Park, S.S., Miller, H., Klotz, A.V., Kloepper-Sams, P.J., Stegeman, J.J. and Gelboin, H. Monoclonal Antibodies to Liver Microsomal Cytochrome P-450E of the Marine Fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross Reactivity with 3-Methylcholanthrene Induced Rat Cytochrome P-450 (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 339-350.
- Parke, D.W. Activation Mechanism to Chemical Toxicity (1987). *Arch. Toxicol.* 60, 5-15.
- Parker, R.S., Morisson, M.T., Moldeus, P. and Selivonchik, D.P. The Use of Isolated Hepatocytes from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in the Metabolism of Acetaminophen (1981). *Comp. Biochem. Phys. B*, 631-633.
- Peakall, D.B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction (1994). *Ecotoxicology* 3, 157-160.
- Peakall, D.B., Walker, C.H. The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates (1994). *Ecotoxicology* 3, 173-179.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J.L., Bennetau, B., Dunogues, J., Le Gac, F. and Sumpter, J.P. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals (1993). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 263-272.
- Penzlin, H. (1989): *Lehrbuch der Tierphysiologie*. 4. Auflage, Gustav Fischer, Stuttgart. 657 Seiten. S. 29-30.
- Pesonen, P., Andersson, T. Characterization and Induction of Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in a Primary Culture of Rainbow Trout Hepatocytes (1991). *Xenobiotica* 21, 461-471.
- Peters, J.H., Baumgarten (Eds.) (1988): *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. 2.Auflage Springer-Verlag, Berlin. 484 Seiten.
- Petrescu, I., Bojan, O., Saied, M., Bärzu, O., Schmidt, F. and Kühnle, H.F. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine-5'-diphosphate as nucleotide substrate (1979). *Anal. Biochem.* 96, 279-281.
- Pluta, H.J. Enzymatic procedures for detection of biotransformation (detoxication activity) of the fish liver - a contribution to monitoring biological effects (1992a). *Schriftenr. Ver. Wasser Boden Lufthyg.* 89, 821-830.
- Pluta, H.-J. (1992b). Investigation on Biotransformation (MFO activities) in Fish Liver. In: *Fish in Ecotoxicology and Ecophysiology*, hrsg. von T.H. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner, VCH, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1-16.
- Poland, A., Knutson, J.C. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity (1982). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517-554.
- Rannug, U., Sjögren, M., Rannug, A., Gillner, M., Toftgard, R., Gustafsson, J.-A., Rosenkranz, H. and Klopman, G. Use of artificial intelligence in structure-affinity correlations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) receptor ligands (1991). *Carcinogenesis* 12, 2007-2015.
- Rogiers, V., Vercruyse, A. Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics (1993). *Toxicology* 82, 193-208.
- Ronis, M.J.J., Celander, M., Foerlin, L. and Badger, T.M. The use of polyclonal antibodies raised against rat and trout cytochrome P 450 CYP1A1 orthologs to monitor environmental induction in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (1992). *Mar. Environ. Res.* 34, 181-8,1992.
- Rusche, B., Kohlpott, M. (1993). The R1-cytotoxicity test as a replacement for the fish test stipulated in the German waste water act. In: *Fish in ecotoxicology and ecophysiology*, hrsg. von T.H. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner, VCH, Weinheim, S. 81-92.
- Sachs, L. (1992a): *Angewandte Statistik*. 7te Auflage. Springer-Verlag, Berlin. 847 Seiten. S. 160.
- Sachs, L. (1992b): *Angewandte Statistik*. 7te Auflage Springer-Verlag, Berlin. 847 Seiten. S. 210.
- Safe, S. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybromated Biphenyls (PBBs): Biochemistry, Toxicology, and Mechanism of Action (1984). *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13, 319-395.
- Sawada, N., Tomomura, A., Sattler, C.A., Sattler, G.L., Kleinman, H.K. and Pitot, H.C. Effects of extracellular matrix components on the growth and differentiation of cultured rat hepatocytes (1987). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 23, 267-273.

## 9. Literatur

- Scheepers, G., Aschmann, C. and Mörchel, S. The Use of Primary Cultured Rat Hepatocytes for the Assessment of Xenobiotic Effects on Biotransformation (1991). *Toxicol. in Vitro* 7, 209-213.
- Schüürmann, G., Marsmann, M. QSAR-Modelle - Interpretation und Prognose der Biokonzentration und aquatischen Toxizität (1991a). *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 3, 42-47.
- Schüürmann, G., Marsmann, M. QSARs in the chemical industry: need, scope and current limitations (1991b). *Sci. Tot. Environ.* 109/110, 671-675.
- Segner, H., Lenz, D. Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line (1993). *Toxicol. in Vitro* 7, 537-540.
- Segner, H., Böhm, R. and Kloas, W. Binding and Bioactivity of Insulin in Primary Cultures of Carp (*Cyprinus Carpio*) Hepatocytes (1993). *Fish Physiol. Biochem.* 11, 411-420.
- Sijm, D.T.H.M. (1992): Influence of biotransformation on bioaccumulation and toxicity of chlorinated aromatic compound in fish. Ph.D. Thesis, Universitat Utrecht. 235 S.
- Sijm, D.T.H.M., Schaap, G. and Opperhuizen, A. The effect of the biotransformation inhibitor piperonylbutoxide on the bioconcentration of 2,8-dichlorodibenzo-P-dioxin and pentachlorobenzene in goldfish (1993a). *Aqu. Toxicol.* 27, 345-360.
- Sijm, D.T.H.M., Wever, H. and Opperhuizen, A. Congener-specific biotransformation and bioaccumulation of PCDDs and PCDFs from fly ash in fish (1993b). *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1895-1907.
- Skelt, P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism-based toxicity testin-solutions? (1994). *Toxicol. in Vitro* 8, 491-504.
- Spacie, A., Hamelink, L. (1984). Bioaccumulation. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, hrsg. von G.M. Rand, S.R. Petrocelli, Taylor & Francis, London, S. 495-525.
- Statham, C.N., Szyjka, S.P. and Menahan, L.A. Fractionation and Subcellular Localization of Marker Enzymes in Rainbow Trout Liver (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 1395-1400.
- Stegeman, J.J. Cytochrome P450 Forms in Fish: Catalytic, Immunological and Sequence Similarities (1989). *Xenobiotica* 19, 1093-1110.
- Stegeman, J.J., Kloepper-Sams, P.J. and Farrington, J.W. Monooxygenase Induction and Chlorobiphenyls in the Deep-Sea Fish *Coryphaenoides armatus* (1986). *Science* 231, 1287-1289.
- Stegeman, J.J., Teng, F.Y. and Snowberger, E.A. Induced Cytochrome P450 in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from Coastal Massachusetts Evaluated by Catalytic Assay and Monoclonal Antibody Probes (1987). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1270-1277.
- Stegeman, J.J., Woodin, B.R. and Goksoyr, A. Apparent Cytochrome P-450 Induction as an Indication of Exposure to Environmental Chemicals in the Flounder *Platichthys flesus* (1988). *Marine Ecol. Prog. Ser.* 46, 55-60.
- Stegeman, J.J., Woodin, B.R. and Smolowitz, R.M. Structure, Function and Regulation of Cytochrome P-450 Forms in Fish (1990). *Biochem. Soc. Trans.* 18, 19-21.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. and Van Veld, P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzymes and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: *Biomarkers: Biological, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, hrsg. von R. Huggert, R.A. Kimerle, P.R. Mehrle Jr. and H.L. Bergman, Lewis Publishers, Boca Raton, S. 235-335.
- Streit, B. Bioaccumulation Processes in Ecosystems (1992). *Experientia* 48, 955-970.
- Suelter, C.H. (1985): A practical guide to enzymology. J. Wiley & Sons, New York. S. 231-264.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment (1995). *Environ. Health Persp.* im Druck.
- Toussaint, M.J.M., Nederbragt, H. Lack of effect of extracellular matrix or 3T3 feeder layer on the maintenance of differentiation or survival time of cultured rat hepatocytes (1995). *Toxicol. in Vitro* 9, 83-90.
- Ueng, T.-H., Ueng, Y.-F. and Park, S.S. Comparative Induction of Cytochrome P-450-dependent Monooxygenases in Livers and Gills of Tilapia and Carp (1992). *Aqu. Toxicol.* 23, 49-64.
- Utesch, D., Oesch, F. Dependency of the *in vitro* stabilization of differentiated functions in liver parenchymal cells on the type of cell line used for co-culture (1992). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 28A, 193-198.
- Utesch, D., Molitor, E., Platt, K.L. and Oesch, F. Differential stabilisation of cytochrome P-450 isoenzyme in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells (1991). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 27A, 858-863.
- Vaillant, C., Monod, G., Valotaire, Y. and Rivière, J.L. Measurement and Induction of Cytochrome P-450 and Monooxygenase Activities in a Primary Culture of Rainbow Trout (*Salmo gairdeni*) Hepatocytes (1989). *C. R. Acad. Sci. Paris* 308, 83-88.
- van der Weiden, M.E.J., van der Kolk, J., Bleumink, R., Seinen, W. and Van, den B.M. Concurrence of P450 1A1 induction and toxic effects after administration of a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (1992). *Aquat. Toxicol.* 24, 123-42, 1992.
- van der Weiden, M.E.J., Celander, M., Seinen, W., van den Berg, M., Goksoyr, A. and Foerlin, L. Induction of cytochrome P450 1A in fish treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or chemically contaminated sediment (1993a). *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 989-99, 1993.
- van der Weiden, M.E.J., Tibosch, H.J.H., Bleumink, R., Sinnige, T.L., van de Guchten, C., Seinen, W. and van der Berg, M. Cytochrome P450 1A induction in the common carp (*Cyprinus carpio*) following exposure to contaminated sediments with halogenated polyaromatics (1993b). *Chemosphere* 27, 1297-1309.
- van't Klooster, G.A.E., Woutersen van Nijntent, F.M.A., Klein, W.R., Blaauboer, B.J., Noordhoek, J. and van Miert, A.S.J.P.A.M. Effects of Various Medium Formulations and Attachment Substrates on the Performance of Cultured Ruminant Hepatocytes in Biotransformation Studies (1992). *Xenobiotica* 22, 523-534.
- Vind, C., Dich, J. and Grunnet, N. Regulation by Growth Hormone and Glucocorticoid of Testosterone Metabolism in Long-Term Cultures of Hepatocytes from Male and Female Rats (1992). *Biochem. Pharmacol.* 44, 1523-1528.
- Vindimian, E., Garric, J. Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities: a chemical pollution indicator (1989). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 18, 277-285.

Voss, J.-U., Seibert, H. Microcarrier Attached Rat Hepatocytes as a Xenobiotic-Metabolizing System in Cocultures (1991). *Cell. Biol. Toxicol.* 7, 387-399.

Voss, J.-U., Seibert, H. Primärkulturen von Ratten-Hepatozyten auf Microcarriern als metabolisierendes System in Toxizitätsprüfungen an Zellkulturen (1992). *Alt. Tierexp.* 16, 25-37.

Weißhaar, D., Gossrau, E. and Faderl, B. Normbereiche von alpha-HBDH, LDH, AP and LAP bei Messung mit substratoptimierten Testansätzen (1975). *Med. Welt* 26, 387-390.

Wolf, K., Mann, J.A. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishing (1980). *In Vitro* 16, 168-179.

Wolf, K., Quimby, M.C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro* (1962). *Science* 135, 1065-1066.

Zahn, T., Braunbeck, T. Isolated Fish Hepatocytes as a Tool in Aquatic Toxicology - Sublethal Effects of Dinitro-O-Cresol and 2,4-Dichlorphenol (1993). *Sci. Tot. Environ., Suppl.* 721-734

Zahn, T., Hauck, C. and Braunbeck, T. (1993). Cytological alterations in fish fibrocytic R1 cells as an alternative test system for the detection of sublethal effects of environmental pollutants: a case study with 4-chloroaniline. In: *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*, hrsg. von W. Hanke, T.H. Braunbeck and H. Segner, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 103-125.

Zhang, Y.S., Andersson, T. and Foerlin, L. Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by beta-naphthoflavone. Time-course studies (1990). *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.* 95, 247-53, 1990.

## Anhang

### Verwendete Puffer und Lösungen

<b>1. Homogenisationspuffer:</b>	
Tris/HCl pH 7,8	50 mM
Saccharose	0,25 M
EDTA-Na <sub>2</sub> (Ethylendiamintetraacetat, Serva)	2 mM
KCl	150 mM
DTT (Dithioeritol, Serva)	1 mM
PMSF (Phenylmethylsulfonylchlorid, Serva)	0,25 mM
<b>2. Mikrosomenpuffer</b>	
Kaliumphosphat pH 7,4	50 mM
Glycerin	20 %
EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mM
DTT	0,1 mM
<b>3. Präperfusionslösung (200 ml):</b>	
HEPES (Serva), pH 7,8	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 mM
KCl	3 mM
NaCl	150 mM
<b>4. Waschlösung (300 ml):</b>	
HEPES, pH 7,8	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 mM
KCl	3 mM
NaCl	130 mM
CaCl <sub>2</sub>	13 mM
<b>5. Perfusionslösung (100 ml):</b>	
0,02 % Collagenase H (Boehringer) in Waschlösung	
<b>6. Probenpuffer:</b>	
Tris/HCl pH 6,8	65 mM
SDS (Serva)	2 %
Mercaptoethanol (Serva)	10 ml/100 ml
Bromphenolblau (Serva)	Spatelspitze
<b>7. Sammelgel:</b>	
Acrylamid (37,5 :1 Acrylamid:Bisacrylamid) (40 %ige Stammlösung von Amresco/Biometra)	3,75 %
Tris/HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 %
TEMED (Serva)	0,1 %
APS (Sigma)	0,1 %
<b>8. Trenngel:</b>	
Acrylamid (37,5 :1 Acrylamid:Bisacrylamid)	10 %
Tris/HCl pH 8,8	360 mM
SDS	0,1 %
Glycerin	4,2 %
TEMED	0,06 %
APS	0,06 %

*Anhang: Puffer und Lösungen*

<b>9. Laufpuffer:</b>	
Glycin	192 mM
Tris	50 mM
SDS	0,1 %
<b>10. Towbin-Puffer:</b>	
Glycin	193 mM
Tris	25 mM
Methanol	20 %
<b>11. Fast Green-Färbe-Lösung:</b>	
0,1% Fast Green (Serva) in 1 %iger Essigsäure	
<b>12. Coomassie-Färbe-Lösung:</b>	
Coomassie Blue R250 (Serva)	2 %
Methanol	40 %
Essigsäure	10 %
<b>13. Coomassie-Entfärbe-Lösung:</b>	
Methanol	30 %
Essigsäure	10 %
<b>14. Blocklösung (in PBS):</b>	
BSA (Serva)	0,5 %
Tween 20 (Sigma)	0,05 %
Na-Azid (Serva)	0,02 %
<b>15. Waschlösung (Blotting):</b>	
0,1 % Triton X (Sigma) in PBS	
<b>16. Peroxidase-Färbe-Puffer, Western Blot (in PBS):</b>	
Chloronaphtol (Serva)	0,034 %
Ethanol	10 %
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %) (Merck)	70-80 µl/100 ml
<b>17. PBS:</b>	
NaCl	0,8 %
KCl	0,02 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,144 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,024 %
pH 7,4	
<b>18. ABTS-Lösung</b>	
ABTS (2,2'-Azino-di-[ethylbenzthiazolinsulfonat]) (Serva)	100 mM
Na-Acetat	115 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %), frisch zusetzen	1 µl/ml
ph-Wert mit Essigsäure auf 4,5 einstellen	

Sektion Chemische Ökotoxikologie  
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Permoserstraße 15  
04318 Leipzig  
Telefon 0341/235-2309  
Telefax 0341/235-2401