

Mechanismen der Aktivierung und Detoxifizierung von Aflatoxin B₁ in verschiedenen Leberzelltypen von Ratten, Mäusen und Waldmurmeltieren

Dissertation zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”
am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mekonnen Gemechu
aus Gendeberet/Shoa, Äthiopien

Mainz 1999

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2000

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 302 "Kontrollmechanismen der Tumorentstehung" und durch ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung (LGFG) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Abkürzungen	1
1 Einleitung	2
1.1 Allgemeines	2
1.2 Chemische Kanzerogenese	3
1.3 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme	6
1.4 Aflatoxin B ₁ -Vorkommen und Metabolismus	10
1.5 Primärer Leberkrebs als multifaktorielles Ereignis:	
Bedeutung der Aflatoxine und Hepatitis B Virus-Infektion	15
1.6 Aufbau der Leber und die Leberzellsubpopulationen	18
1.6.1 Aufbau der Leber	18
1.6.2 Die Leberzellsubpopulationen	20
1.6.3 Morphologie und Funktion der Nichtparenchymzellen	21
1.6.4 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme in den einzelnen Leberzellsubpopulationen	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Materialien	25
2.1 Chemikalien und Biochemikalien	25
2.2 Häufig verwendete Stammlösungen und Puffer	26
2.3 Verwendete Geräte	28
3 Methoden	30
3.1 Versuchstiere und Induktionsbedingungen	30
3.2 Isolierung der Leberparenchymzellen	30
3.3 Isolierung der Nichtparenchymzellen	32
3.4 Bestimmung der Zellzahl, Vitalität und Reinheit der isolierten Zellen	33
3.5 Herstellung der subzellulären Leberfraktionen von Ratten, Mäusen und Waldmurmeltieren	34
3.5.1 Mikrosomenpräparation aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Ratte	34
3.5.2 Subzelluläre Leberfraktionen von HBV-transgenen und Kontrollmäusen	34

3.5.3 Subzelluläre Leberfraktionen von Waldmurmeltieren	35
3.6 Charakterisierung von subzellulären Leberfraktionen.....	36
3.6.1 Bestimmung des Proteingehalts der Leberfraktionen.....	36
3.6.2 Bestimmung des Cytochrom-P450-Gehalts.....	36
3.6.3 Methoden zur Aktivitätsbestimmungen verschiedener Cytochrom P450-Isoenzymen	37
3.6.3.1 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin O -deethylase.....	37
3.6.3.2 Bestimmung der 7-Cumarinhydroxylase und 7-Ethoxycumarin-O- deethylase	38
3.6.3.3 Inkubation mikrosomaler Fraktionen mit Testosteron.....	38
3.6.4 Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen Epoxidhydrolase.....	40
3.6.5 Aktivitätsbestimmung cytosolischer Glutathion-S-transferase.....	41
3.7 Methoden der Biotransformationsstudien von AFB ₁	42
3.7.1 Inkubation von Aflatoxin B ₁ mit mikrosomalen Fraktionen der Parenchym- und Nichtparenchymzellen-.....	42
3.7.2 Aufarbeitung der Inkubationsansätze und Chromatographische Trennung von AFB ₁ -Metaboliten.....	42
3.7.3 Inkubation von Aflatoxin B ₁ mit Mikrosomen der Kontroll- und HBV transgenen Mäusen sowie mit mikrosomalen Fraktion aus WHV-freien und WHV-infizierten Waldmurmeltiere.....	44
3.7.4 Chromatographische Trennung und Quantifizierung der [G-3H]Aflatoxin B ₁ -Metabolite.....	44
3.8 Zellbiologische Methoden-.....	45
3.8.1 Isolierung der Maushepatozyten.....	45
3.8.2 Kultivierung der Maushepatozyten und Behandlung mit Phenobarbital und TGF-β ₁	46
3.8.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und immunologischer Nachweis von Cytochrom P450 Isoformen.....	47
3.8.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.8.3.2 Western-Blotting und Immunologische Proteinnachweis.....	49
3.8.4 Nachweis der Apoptose nach Behandlung der Maushepatozytenkultur mit TGF-β ₁	50
3.8.4.1 Morphologische Untersuchungen.....	50
3.8.4.2 Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Apoptose.....	51

4 Ergebnisse	53
4.1 Verteilung und Induktion von Aflatoxin B ₁ -metabolisierenden Enzymen in verschiedenen Leberzelltypen der Ratte	53
4.1.1 Ausbeute und Reinheit der Leberzelltypen	53
4.1.2 Cytochrom P450-Gehalt	53
4.1.3 Testosteron-Metabolismus in Mikrosomen aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen von unbehandelten Ratte	54
4.1.4 Testosteron-Metabolismus in Mikrosomen aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen von vorbehandelten Ratte	55
4.1.5 Optimierung der chromatographischen Trennung der Aflatoxin B ₁ -Metabolite	59
4.1.6 Identifizierung des Aflatoxin B ₁ -Glutathion-Konjugats	62
4.1.7 Zeit- und Proteinabhängigkeit des metabolischen Umsatzes von Aflatoxin B ₁	63
4.1.8 Metabolismus von AFB ₁ durch Mikrosomen aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Rattenleber	65
4.2 Untersuchung zur Interaktion zwischen AFB ₁ und HBV-Infektion in zwei Tiermodellen für chronisch aktive Hepatitis	69
4.2.1 Studien in HBV-transgenen- und Kontrollmäusen	69
4.2.1.1 Cytochrom P450 Gesamtgehalt und Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme	69
4.2.1.2 Testosteron-Metabolismus in HBV-transgenen und Kontrollmäusen	70
4.2.1.3 Western Blot-Analyse des mikrosomalen CYP2A5-Isoenzym	70
4.2.1.4 mikrosomalen Epoxidhydrolase und cytosolischen Glutathion-S-transferasen und	72
4.2.1.5 AFB ₁ -Metabolismus mit Mikrosomen aus HBV-transgenen- und Kontrollmäusen	72
4.2.2 Studien in WHV-freien und WHV-infizierten Waldmurmeltieren	74
4.2.2.1 Vergleich der Cytochrom P450-abhängigen Enzymaktivitäten und Aktivitäten cytosolischer Glutathion-S-transferasen	74
4.2.2.2 Testosteron Metabolismus in Mikrosomen der Waldmurmeltiere	75
4.2.2.3 AFB ₁ -Metabolismus mit Mikrosomen aus Virus-infizierten und Virus freien Waldmurmeltieren	76

4.3 Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5 in Kulturen von Maushepatozyten.....	80
4.3.1 Kultivierung von Hepatozyten der Maus	80
4.3.2 Einfluß von TGF- β_1 auf die Vitalität der Hepatozytenkultur	80
4.3.3 Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5 in kultivierten Maushepatozyten.....	81
4.3.4 Western Blot Analyse der CYP2A5-Isoenzym.....	81
4.3.5 Morphologische und DNA-Fragmentierungsstudien zum Nachweis der Apoptose.....	85
5 Diskussion.....	89
5.1 Verteilung von Aflatoxin B ₁ -metabolisierenden Enzymen in verschiedenen Leberzelltypen.....	89
5.2 Interaktion zwischen Aflatoxin B ₁ und Hepatitis B-Virus in zwei Tiermodellen für chronisch aktive Hepatitis.....	96
5.2.1 Vergleich der hepatischen Boitransformation in HBV-transgen- und kontrollmäuse.....	96
5.2.2 Vergleich der hepatischen Boitransformation in WHV-infizierten und WHV-freien Waldmurmeltieren	98
5.3 Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5-Isoenzym in Kulturen der Maushepatozyten.....	102
5.4 Ausblick.....	105
6 Zusammenfassung.....	106
7 Literaturverzeichnis.....	108
8 Danksagungen.....	124
9 Publikationsliste.....	125
10 Lebenslauf.....	126

Abkürzungen

AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFB-E	Aflatoxin B ₁ -8,9-Epoxid
AFB ₁ -GSH-Konjugat	(8,9-Dihydro-8-(S-glutathionyl)-9-hydroxy-aflatoxin B ₁
ARO	Aroclor 1254
BHA	3-(2)-tert-Butyl-4-hydroxyanisol
Bq	Bequerel
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
COH	Cumarin-7-hydroxylase
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
ECOD	Ethoxycumarin-O-deethylase
EROD	Ethoxyresorufin-O-demethylase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transferase
HBsAg	Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
ISO	Isosafrol
kDa	Kilodalton
Kon	Kontrollversuch
M	Molar
3-MC	3-Methylcholanthren
MW	Molekulargewicht
NADP(H)	Nicotinamid-adenindinucleatid-phosphat (reduziert)
NPC	Nichtparenchymzellen
PB	Phenobarbital
PC	Parenchymzellen
RT	Raumtemperatur
S-9	Postmitochondriale Leberfraktionen
STO	Styroloxid
TGF-β ₁	Transforming Growth Factor beta 1
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Units pro Minute
UV/VIS	Ultraviolett/Sichtbarer Wellenlängenbereich
WHV	Hepatitis-Virus des Waldmurmeltiers
WHsAg	Oberflächenantigen des Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Häufigkeit maligner Krebserkrankungen hat in den letzten fünfzig Jahren drastisch zugenommen. Insbesondere für die Menschen in den westlichen Industriestaaten stellt diese Krankheitsgruppe die zweithäufigste Todesursache nach den Herz- und Kreislaufkrankungen dar (Statistisches Bundesamt, 1995).

Die bisherigen Forschungsansätze haben viel zum Verständnis der Tumorentstehung auf zellulärer und molekularer Ebene beigetragen. Trotz dieser Fortschritte werden aber immer noch Vorbeugung und therapeutische Möglichkeiten durch die multifaktoriellen Ursachen vieler Tumorarten sowie den vielstufigen Prozeß der Kanzerogenese erschwert.

Fernziel der Krebsforschung ist es, alle krebsauslösenden Faktoren sowie deren Mechanismen aufzuklären und biologische Veränderungen frühestmöglich zu diagnostizieren, daneben aber auch präventive und therapeutische Maßnahmen zu entwickeln.

Im Prinzip kann Krebs durch irgendeinen Fehler im Zellgeschehen verursacht werden, zum Beispiel während der Verdopplung von Genen vor der Zellteilung oder durch normale Alterungsprozesse des Organismus oder durch genetische Prädisposition einzelner Individuen. Diese spontan oder genetisch auftretenden Tumore sind jedoch nur für einen sehr geringen Bruchteil aller Krebsfälle beim Menschen verantwortlich (Zabel, 1993).

Die meisten Krebserkrankungen werden durch äußere Einflüsse verursacht, die die Zelle derart beeinflußt, daß sie neoplastisch entartet. Diese krebsauslösenden Umweltfaktoren lassen sich in drei Gruppen einteilen: energiereiche Strahlung, bestimmte Viren sowie eine Vielzahl kanzerogener Chemikalien.

Energereiche Strahlung, vor allem hohe Dosierungen von α -, β -, γ - und Röntgenstrahlen aber auch ultraviolette Strahlung sind krebsregend. Wie durch diese physikalische Faktoren Krebs entsteht, ist noch nicht völlig geklärt. Man nimmt an, daß diese Faktoren Veränderungen in der DNA auslösen, die entweder durch Strangbrüche oder über die Bildung von Pyrimidin-Dimeren zu Mutationen führen (Mullaart et al., 1990; Henschler, 1991).

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß nicht nur onkogene Viren sondern auch andere Viren wie Epstein-Barr-Virus und Herpes-Simplex-Typ-II-Virus an der Entstehung zumindest

einiger menschlicher Krebsformen beteiligt sind. Die chronische Hepatitis B wird als ein starker Risikofaktor für das Leberzellkarzinom angesehen. Einige andere Viren wie Papillomviren der Typen 16 und 18 sind weltweit für 70% der Erkrankung des Gebärmutterhalses verantwortlich. Insgesamt lassen sich zur Zeit weltweit etwa 15% der Krebserkrankungen mit Virusinfektionen in Verbindung bringen (Schirmacher, 1989). Ein wichtiger Mechanismus der tumorinduzierenden Wirkung bestimmter Viren beruht darauf, daß sie durch eine Mutation oder Vermehrung eines zellulären Protoonkogens ihr onkogenes Potential entfalten können. Die Protoonkogene sind DNA-Sequenzen, die an der normalen Differenzierung und Proliferation von Zellen beteiligt sind. Außerdem können durch tumorassoziierte Viren Onkogene in Körperzelle gelangen, deren Expression ein unkontrolliertes, malignes Zellwachstum zur Folge haben kann (Bishop, 1990; Howley, 1991).

Durch die epidemiologischen Krebsforschung weiß man jedoch heute, daß die Mehrzahl der Krebserkrankungen beim Menschen auf chemisch ausgelöste Prozesse zurückgeführt werden kann. Dazu gehören neben dem Tabakrauch, natürliche und synthetische Verbindungen in der Luft, im Trinkwasser, in der Nahrung sowie auch in Arzneimitteln (Dol & Peto, 1981; Prescott & Flexer, 1990; Schirmacher, 1989).

1.2 Chemische Kanzerogenese

Bereits im Jahre 1775 beschrieb Percival Pott das gehäufte Auftreten von Hodenkrebs bei Kaminfeuern (Pott, 1775). Aber erst im Jahr 1914 konnten Yamagiwa und Ichikawa (1915) zeigen, daß sich durch Bestreichen von Kaninchenohren mit Steinkohlenteer Hauttumoren erzeugen lassen. Inzwischen existieren zwei wichtige Versuchstiermodelle der chemischen Kanzerogenese: die Mäusehaut und die Rattenleber. Unter Verwendung dieser Modelle sind heute zahlreiche chemische Kanzerogene entdeckt worden.

Chemische Kanzerogene können unterschiedlichen Stoffklassen angehören. Sie werden nach ihrem Wirkungsmechanismus in zwei Gruppen eingeteilt: DNA-reaktive, gentoxische sowie nicht-gentoxische (sogenannte epigenetische) Stoffe.

Bei den DNA-reaktiven, gentoxischen Substanzen handelt es sich um elektrophile Verbindungen, die mit nukleophilen Zentren in der DNA reagieren können. Dabei werden direkte und indirekte gentoxische Kanzerogene unterschieden.

Direkt wirkende Kanzerogene sind selbst elektrophile Verbindungen und zeigen unmittelbar alkylierende Reaktivität. Zu dieser Gruppe gehören halogenierte Ether,

Nitrosoharnstoffe, Epoxide, Aziridine u.a.. Die Zahl der direkt wirkenden Kanzerogene ist relativ klein (IARC, 1987; Tomatis et al., 1989).

Die meisten chemischen Kanzerogene wirken indirekt, da sie selbst nicht chemisch reaktiv sind, sondern ihre alkylierenden Eigenschaften erst nach Biotransformation entfalten. Dies gilt z.B. für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) wie Benzo[a]pyren, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, für aromatische Amine, für N-Nitroso-Verbindungen sowie für Naturstoffe wie Safrol und Aflatoxin B₁. Die Abbildung 1.1 zeigt verschiedene Strukturen ausgewählter chemischer Kanzerogene.

Diese Substanzen werden hauptsächlich durch Enzyme aus der Gruppe der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen zu den ultimalen Kanzerogenen, hochreaktiven elektrophilen Derivaten umgewandelt, die spontan mit nukleophilen Zentren in der DNA kovalente Bindung eingehen. Wird ein solcher DNA-Schaden durch zelleigene Reparaturmechanismen nicht repariert, kann das zur Mutation in bestimmten Genen und damit zu einer Veränderung der darin kodierten Information führen. Heute geht man davon aus, daß zwischen der Anhäufung von Mutationen und der Krebsentstehung eine enge Verbindung besteht, und daß die Transformation einer normale Zelle in eine Krebszelle in vielen Einzelschritten über mehrere oder sogar viele Zellgenerationen verläuft.

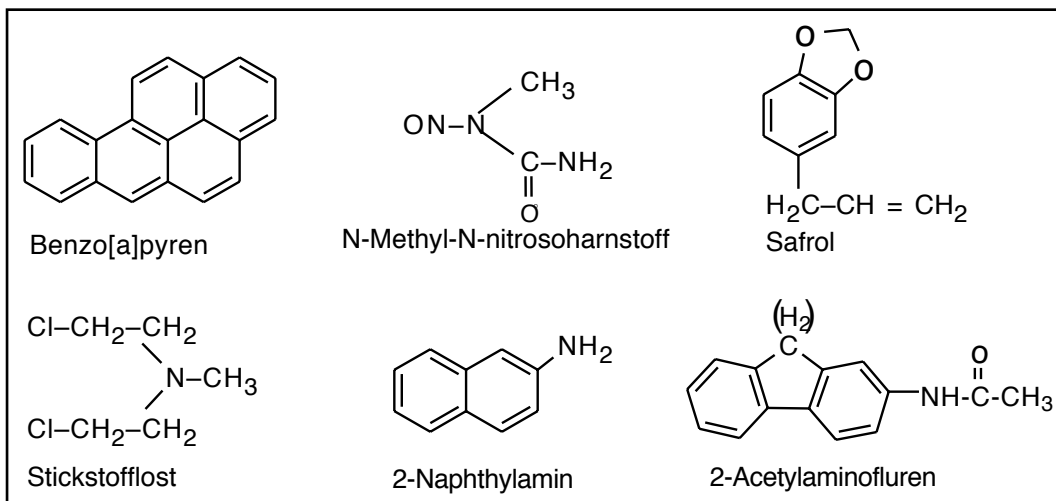


Abb.1.1: Strukturen einiger chemischer Kanzerogene

Außer den alkylierenden Substanzen gibt es eine Reihe von chemischen Kanzerogenen, die keine direkte genotoxische Wirkung zeigen. Hierzu gehören Hormone (17β-Estradiol, Diethylstilbestrol), cytotoxisch wirkende Substanzen, Antioxidantien, Peroxisomenproliferatoren und Tumorpromotoren (chlorierte aromatische Kohlen-

wasserstoffe, wie PCBs und TCDD). Die chemischen Kanzerogene dieser Gruppe erhöhen die Tumorraten, indem sie auf die Zelldifferenzierung und Zellteilung einwirken (Clayson et al., 1994).

Untersuchungen der chemischen Kanzerogenese in der Mäusehaut und in der Rattenleber haben gezeigt, daß für die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle viele Einzelschritte erforderlich sind (Miller et al., 1981; Farber, 1984; Harris, 1991, Marks & Fürstenberger, 1995). Nach dieser Mehrstufen-Hypothese der Kanzerogenese lassen sich bei der Tumorentstehung drei Stadien unterscheiden (Abb. 1.2).

Die Initiation stellt den ersten Schritt zum Tumorwachstum dar. Zur Initiation kommt es, wenn Zellen einer DNA-schädigenden Substanz (direkten bzw. indirekten Kanzerogenen) oder Strahlen ausgesetzt werden. Wenn die entstandene DNA-Läsion nicht durch Reparaturprozesse beseitigt wird, führt die Replikation der Zelle zur Entstehung einer mutierten Zellpopulation (Pitot, 1989).

Tumorinitiatoren lösen bereits nach einmaliger Anwendung eine irreversible Veränderung aus. Ob daraus Tumoren entstehen können, hängt sowohl von Art und Menge der kanzerogenen Substanz, als auch von der Mitwirkung anderer Kanzerogener ab. Die so initiierte Zellen können nur verschwinden, wenn sie durch Apoptose absterben (Bursch et al., 1992). In den meisten Fällen wird jedoch eine initiierte Zelle aufgrund der fehlender phänotypischer Veränderung vom Immunsystem nicht erkannt.

Unter Tumorpromotion versteht man, wenn die initiierte Zelle durch eine zweite Substanz in eine Krebszelle umgewandelt wird, wobei der Tumorpromotor die klonale Expansion der mutierten Zelle fördert.

Im Gegensatz zu den Initiatoren sind viele Tumorpromotoren keine aktivierten Metabolite und induzieren allein nur selten ein Tumorwachstum. Deshalb müssen Tumorpromotoren nach dem Initiator wiederholt über mehrere Wochen appliziert werden. Zu den Promotoren zählen sowohl endogene (Hormone, Wachstumsfaktoren etc.) als auch exogene (cytotoxische Agenzien wie Tetrachlormethan, Enzyminduktoren wie Phenobarbital, Mitogene wie Phorbolester etc.) Substanzen. Während die Initiation einen irreversiblen Vorgang darstellt, ist die Tumorpromotion nach Entfernung des Promotors reversibel. Der Wirkungsmechanismus der meisten Tumorpromotoren ist noch unklar, aber in vielen Fällen scheinen sie die Zellproliferation zu fördern oder die Apoptose zu hemmen. Für viele nicht-genotoxischen Kanzerogene wird heute ein promotionsähnlicher Wirkungsmechanismus diskutiert. In der Leberzellen bilden sich während der Promotionsphase präneoplastische Foci, die sich von normalen Zellen durch eine Veränderung der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme

unterscheiden. Nach wiederholten Gabe eines Leberkanzerogens vergrößern sich die Foci und werden als benigne Noduli makroskopisch sichtbar. Daraus bildet sich ein benigne Tumor, der sich schließlich zum hepatozellulären Karzinom entwickelt (Schulte-Hermann et al., 1995; Moore et al., 1987).

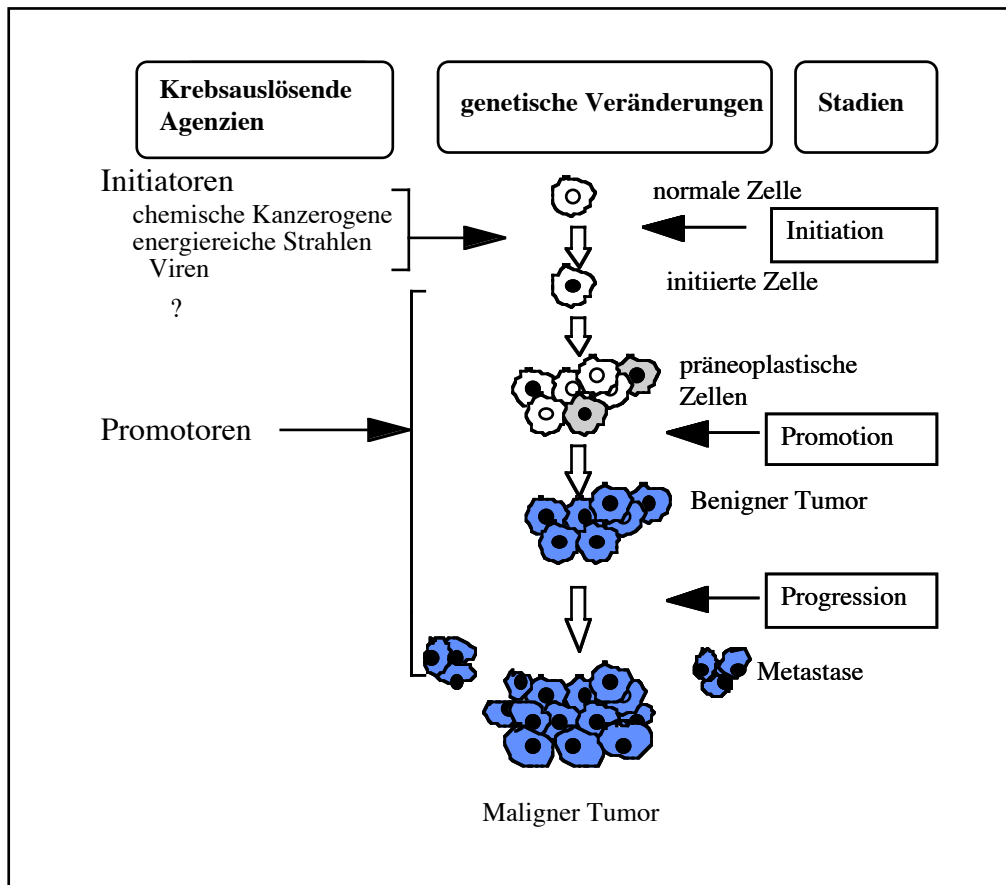


Abb. 1.2: Vereinfachtes Schema des Dreistufenmodells der Kanzerogenese.

Die Progression wird als Prozess der Umwandlung präneoplastischer Zellen und benigner Neoplasmen in maligne Tumore angesehen, die nach Ausbreitung in andere Organe invasiv wachsen (Hennings et al., 1983).

1.3 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme

Ständig ist der menschliche Körper mit einer Vielzahl von chemischen Verbindungen konfrontiert, die er mit der Atemluft, mit der Nahrung oder über die Haut aufnimmt. Die meisten dieser körperfremden Stoffe sind lipophiler Natur. Da nur wasserlösliche Substanzen ausgeschieden werden können, muß die Hydrophilie dieser Substanzen durch Einführung oder Freilegung polare Gruppen sowie deren Konjugation, also durch den Vorgang der Biotransformation, erhöht werden. In der Regel führt die Biotransformation von Fremdstoffen zu Metaboliten mit geringerer biologischer Aktivität;

es können aber auch je nach Substanz und Metabolisierungsweg reaktive und damit toxische Metabolite entstehen.

Die Biotransformation von Fremdstoffen (und auch endogener Stoffe) wird durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme katalysiert, die besonders in der Leber, aber auch in der Niere, Lunge, Darm und Haut vorkommen. Man unterteilt die Biotransformationswege in zwei Phasen:

In der ersten Phase läuft eine Funktionalisierungsreaktion ab, in der das Substrat oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch polare Gruppen (-OH, -NH₂, -COOH, -SH) erhält. Die so modifizierten Metabolite werden in der zweiten Phase enzymatisch mit endogenen Verbindungen (z.B. Glucuronsäure, Schwefelsäure oder Glutathion) konjugiert.

Eine besondere wichtige Rolle innerhalb der Phase I Reaktion nehmen die Enzyme der Cytochrom P450 Superfamilie ein, die hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Leber, aber auch in anderen Organen vorkommen.

Die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYP; E.C. 1.14.14.1) katalysieren verschiedene Reaktionen, überwiegend jedoch die Sauerstoffübertragung auf das Substrat. Dabei wird ein Atom des molekularen Sauerstoffs auf das Substrat übertragen - daher der Name Monooxygenase - und das andere unter NADPH-Verbrauch zu Wasser reduziert. Um ihre Funktion zu erfüllen, benötigen diese Enzyme molekularen Sauerstoff, den reduzierenden Kofaktor NADPH sowie die Cytochrom P450 Reduktase. Die CYP Enzyme sind Hämproteine mit einem Eisen-Atom im aktiven Zentrum. Die isolierten und gereinigten CYP Enzyme zeigen das für Hämproteine typische Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 420 nm, das sich nach Reduktion und Behandlung mit Kohlenmonoxid (CO) nach 450 nm verschiebt (daher die Bezeichnung P450; P = Pigment).

Die CYP Superfamilie besteht aus sehr vielen einzelnen Isoenzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität und Reaktionsmechanismen (Lu & West, 1980). In jüngster Zeit wurde die Nomenklatur dieser Enzyme auf der Basis der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen vereinheitlicht (Nelson et al., 1993). Die CYP-Superfamilie (alle Familien zusammen) wird in Familien (arabische Zahl), und diese wiederum in Unterfamilien (Großbuchstabe) unterteilt. Schließlich werden die individuellen Enzyme innerhalb einer Unterfamilie mit einer weiteren arabischen Zahl (z.B. CYP1A1) bezeichnet. Die wichtigste Kriterium für die Zuordnen zu einer Familie ist die Sequenzhomologie. Wenn die CYP eine Aminosäuresequenz-Homologie von > 40% besitzen, gehören sie zu einer Familie, während sie bei Sequenzhomologien von > 55% der gleichen Unterfamilie zugeordnet werden.

Neben der Umsetzung von Fremdstoffen besitzen CYP-Enzyme auch endogene Funktionen. Sie sind beispielsweise an der Bildung von Gallensäuren, Steroidhormonen sowie Fettsäuren und Eicosanoide beteiligt (Wolf, 1986).

Ein wichtiges Charakteristikum der CYP-Familie ist ihre Induzierbarkeit (Conney, 1982). Viele Arzneimittel und Umweltstoffe beeinflussen den Metabolismus, indem sie die Aktivität bestimmter CYP-Isoenzyme erhöhen und dabei ihren eigenen Metabolismus oder den anderer Verbindungen verändern. Diese Eigenschaft von CYP ist ein wichtiger Mechanismus bei der Arzneimittelinteraktion nach chronischer Gabe von induzierenden Arzneistoffen. Klassische Induktoren wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon und Aroclor 1254 werden bei der Erforschung des Fremdstoffmetabolismus eingesetzt.

Die Epoxidhydrolasen (EC 3.3.2.3, EH) kommen sowohl in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (mEH) wie auch im Cytosol (cEH) vor. Die mEH und cEH besitzen keine strukturelle Verwandtschaft und zeigen eine unterschiedliche Substratspezifität. Beispielsweise stellen die trans-substituierten Epoxide bessere Substrate für die cytosolische EH (cEH) dar, während die cis-substituierten und die Arenoxide durch die mikrosomale EH (mEH) besser umgesetzt werden.

Die mikrosomale EH ist von besonderer toxikologischer Bedeutung, da dieses Enzym katalytisch die durch CYP gebildeten hochreaktiven Epoxiden durch Wasseranlagerung zu trans-Dihydrodiolen spaltet und damit inaktiviert (Oesch, 1973). Daher vermag die mEH, auch bedingt durch ihre räumliche Nähe zu CYP im endoplasmatischen Retikulum viele potentiell kanzerogenen Epoxide effizient zu entgiften. Im Fall der Arenoxide der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe können die inaktiven Dihydrodirole jedoch erneut durch CYP epoxidiert werden. Die dabei gebildeten Bay-Region-Dihydrodirolepoxide werden als schlechte Substrate der mEH von dieser kaum hydrolysiert und stellen starke Mutagene und Kanzerogene dar (Wood et al., 1976).

Die membranständigen UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT; E.C. 2.4.1.17) bilden wie die CYP eine Superfamilie. UGT sind hauptsächlich in der Leber lokalisiert, findet sich in geringen Aktivität aber auch in anderen Organen. Quantitativ gesehen sind die UGT Isoenzyme die wichtigsten Phase II Enzyme, die die Konjugation von nukleophilen Substraten wie Phenolen, aliphatischen Alkoholen, Aminen, Thiolen sowie Carbonsäuren katalysieren. Als Ko-Substrat dient ihnen die α -UDP-Glucuronsäure, die aus α -D-Glucose-1-phosphat synthetisiert wird (Mulder et al., 1990).

Die Glucuronidierung führt meist zur Detoxifizierung und die Konjugate sind auch wasserlöslicher als die Ausgangssubstanz. Durch Glucuronidierung erhöht sich die relative Molmasse des Substrats, welches biliär sezerniert und über die Faeces ausgeschieden wird. Die UGTs konjugieren auch endogene Substrate wie Testosteron, 17 β -Estradiol und Bilirubin.

Wie die CYP Enzyme handelt es sich auch bei den UGT um eine Gruppe von Isoenzymen mit zum Teil überlappender Substratspezifität. Außerdem sind sie durch klassische Enzyminduktoren wie Phenobarbital und 3-Methylcholanthren, aber auch durch Clofibrat, 3-(2)-tert -Butyl-4-hydroxyanisol und Pregnelonon induzierbar (Burchell et al., 1985; Bock, 1987).

Zu den wichtigsten und toxikologisch bedeutensten Phase II Enzymen gehören die Glutathion-S-transferasen (GST; E.C.2.5.1.18). die vorwiegend im Cytosol der Leberzellen in hohen Konzentrationen vorkommen. Die cytosolische GST (cGST) katalysieren die Konjugation von elektrophilen Substanzen mit dem Tripeptid Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin, GSH). Im allgemeinen werden hierdurch nicht nur solche reaktiven Elektrophile wie Epoxide sondern auch α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen, reaktive Ester, Chinone und reaktive Sauerstoffspezies sowie freie Radikale abgefangen, bevor sie wegen ihrer hohen Reaktivität kritische Zellbestandteile schädigen. Hinzu kommt, daß durch Konjugation mit Glutathion die relative Molmasse des Substrates deutlich erhöht wird, welches in die Galle sezerniert und mit den Faeces ausgeschieden wird (Mannervik & Danielson, 1988; Coles & Ketterer, 1990).

Die cytosolischen GST sind dimere Proteine und bestehen aus mehreren Isoenzymen, die sich in ihrer Substratspezifität, Organverteilung und in ihren physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Untereinheiten der cytosolischen GSTs werden in vier Familien eingeteilt: α (Alpha), μ (My), π (Pi) und ϕ (Theta) (Mannervik et al., 1985; Meyer, 1991). Die Existenz der cGST in einer großen Anzahl von Isoenzymen, zusammen mit ihrer breiten Substratspezifität, befähigt den Organismus, eine Vielzahl von hydrophoben elektrophil reaktiven Verbindungen effektiv zu detoxifizieren. Die cGST werden durch Enzyminduktoren wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, trans-Stilbenoxid, Aroclor 1254 und Antioxidantien wie Ethoxyquin und 3-(2)-tert-Butyl-4-hydroxyanisol induziert (Okuda et al., 1989; Hayes et al., 1991). Die Schutzwirkung bestimmter Pflanzeninhaltsstoffen (Dithiolthione), die zum Beispiel in vielen Gemüsesorten vorkommen oder deren synthetische Varianten wie Oltipraz (Arzneimittel gegen Schistosomiasis) gegen die kanzerogene Wirkung von AFB₁ in Labortieren wurde mit dem Induktionseffekt dieser Substanzen auf die cytosolische GST erklärt (Liu et al., 1988; Ramsdell & Eaton, 1988; Kensler et al., 1992). Bei der Chemo-prävention von

Krebs, insbesondere bei Menschen mit einem erhöhten Risiko für Leberkrebs macht man sich diese Tatsache zunutze.

Die membranständige GST (mGST), die keine strukturelle Verwandtschaft mit der cGST aufweist, läßt sich in geringerer Aktivität in Mikrosomen, Mitochondrien und Kernmembranen nachweisen (Morgenstern, 1982). Zu den Substraten der mGST zählen die lipophilen halogenierte Kohlenwasserstoffe, unter anderem das kanzerogen Hexachlorbutadien (Oesch & Wolf, 1989).

Die Sulfotransferasen (ST; EC 2.8.2) sind eine Gruppe von cytosolischen Enzymen, die die Reaktion zwischen dem aktiven Sulfat in 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und Fremdstoffen mit nukleophilen Gruppen (Phenole, Hydroxylamine, Arylamine) katalysieren. Das von der ST als Ko-Substrat benötigte PAPS wird im Körper aus anorganischem Sulfat und ATP synthetisiert (Mulder & Jakoby, 1990). Die Substrate der ST werden ebenfalls durch UGT konjugiert, während jedoch die ST eine größere Effizienz bei niedriger Substratkonzentration besitzt, entfaltet die UGT bei höherer Konzentration eine stärkere detoxifizierende Kapazität.

ST kommen außer in der Leber auch in vielen anderen Geweben (z.B. Darm, Niere, Lunge, Blut) vor. Die Sulfatierung stellt auch einen wichtigen Biotransformationsweg für viele endogene Verbindungen wie Steroide, Kohlenhydrate und Proteine dar.

1.4 Aflatoxin B₁-Vorkommen und Metabolismus

Erst Anfang der sechziger Jahre begann die Forschung über toxikologisch relevante Stoffwechselprodukte bestimmter Schimmelpilze, nachdem in England Tausende von Truthähnen (Turkey X disease) aus zunächst ungeklärter Ursache gestorben waren. Schließlich fand eine Expertengruppe heraus, daß die Tiere mit Erdnußmehl aus Brasilien gefüttert worden waren, das in starkem Maße mit dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* kontaminiert war. Aus den toxischen Erdnußproben ließ sich eine hochpotente Substanz isolieren, die ihren Namen Aflatoxin nach dem Produzenten erhielt. In den folgenden Jahren wurden weitere toxische Substanzen aus Schimmelpilzen isoliert. Diese Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen, die nach Exposition eine Reihe von toxischen Symptomen hervorrufen, werden als Mykotoxine bezeichnet (Bennet, 1987). Man kennt heute weit über 200 derartige Substanzen, die verschiedenen chemischen Stoffgruppen zuzuordnen sind (Huff et al., 1988).

Aflatoxine werden durch die Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produziert. Die Pilze bevorzugen warme und feuchte Klimabedingungen,

weshalb sie vermehrt in tropischen und subtropischen Zonen vorkommen. Die Pilze befallen häufig Lebensmittel wie Erdnüsse, Mais, Weizen, Reis und Sojabohnen.

Bei den strukturell verwandten Aflatoxinen handelt es sich um eine Gruppe von Difurocumarin-Derivate mit einem heterozyklischen Grundgerüst aus fünf Ringen. Vertreter diese Gruppe (Abb. 1.3) sind Aflatoxin B₁, B₂, G₁, und G₂, die gegenüber Säugerzelle akut toxisch und mutagen, im Versuchstier kanzerogen und teratogen sind, wobei AFB₁ der am häufigsten gebildete Lebensmittelkontaminant darstellt und gleichzeitig die höchste Toxizität besitzt. Die Toxizität der anderen Aflatoxine nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: AFB₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂.

Aflatoxin B₁ schädigt in erster Linie die Leber, es können aber auch andere Organe in Abhängigkeit von der Applikationsart und der Tierspezies betroffen sein.

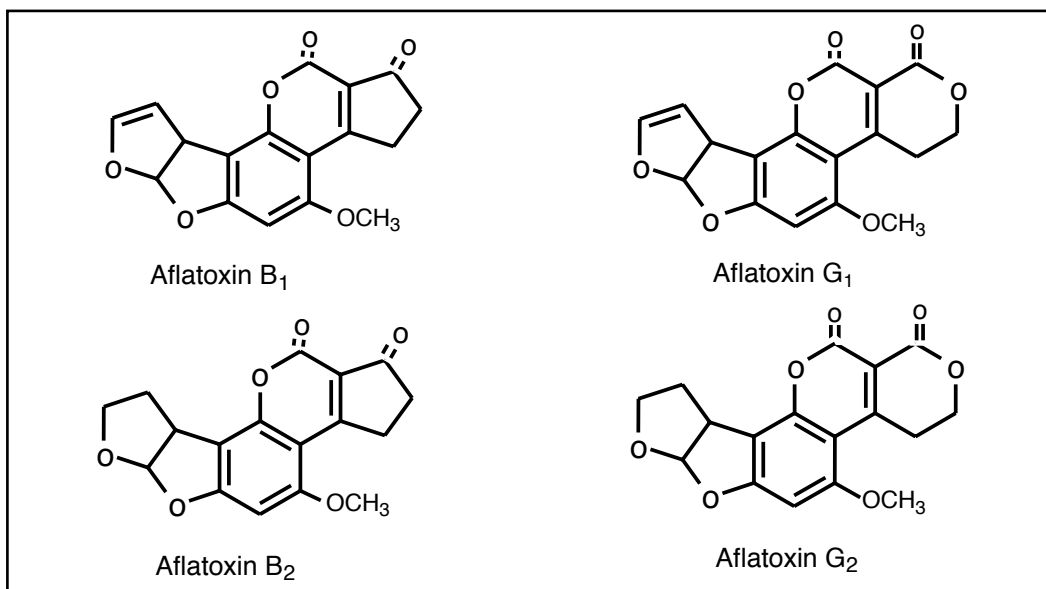


Abb. 1.3: Strukturformeln wichtiger Aflatoxine

AFB₁ selbst besitzt weder mutagene noch DNA-bindende Eigenschaften. Erst nach Biotransformation über den oxidativen Metabolismus der CYP entsteht das Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid, das für die mutagene und kanzerogene Wirkung verantwortlich gemacht wird (Lin et al., 1977, Essigmann et al., 1982).

Dieses ultimale Kanzerogen ist elektrophil reaktiv und bindet kovalent an nukleophile Positionen in der DNA. In vivo und in vitro Studien konnten zeigen, daß die Bindung vorwiegend am Stickstoffatom N-7 von Guanin stattfindet (Martin & Garner, 1977; Raney et al., 1993). Die so modifizierte Base 8,9-Dihydro-8-(N⁷-guanyl)-9-hydroxy aflatoxin B₁ (Abgekürzt: AFB₁-Guanin) läßt sich im Urin von Menschen nachweisen (Groopman et al.,

1992). Die Bildung von AFB₁-Guanin-Addukt ist von toxikologischer Relevanz, da das Addukt in die Formamidopyrimidin-Form mit geöffnetem Ring übergeht. Diese Struktur ist gegenüber dem DNA-Reparaturmechanismen der Zelle verhältnismäßig stabil. Daher persistiert dieser Fehler in der DNA und es können dauerhafte Mutationen entstehen (Raney et al., 1992; Iyer et al., 1994).

In jüngster Zeit wurde gezeigt, daß die CYP-abhängige Aktivierung von AFB₁ stereoselektiv abläuft, indem AFB₁-exo-8,9- und endo-8,9-Epoxid gebildet wird. Wie DNA-Bindungsstudien zeigen, gilt das AFB₁-exo-8,9-Epoxid als ultimales Kanzerogen, da seine Bindungstendenz an N-7 von Guanin höher als die des endo-Isomers ist (Raney et al., 1992; Iyer et al., 1994).

Bei der metabolischen Aktivierung von AFB₁ (Abb. 1.4) spielen zwei humane CYP-Isoenzyme, nämlich CYP3A4 und CYP1A2, eine dominierende Rolle, eine Aktivierung kann aber auch durch CYP2A6, CYP2B6 und CYP3A3 erfolgen (Shimada & Guengerich, 1989; 1982; Forrester et al., 1990; Aoyama et al., 1990).

In der Ratte sind verschiedene CYP-Formen an der Aktivierung von AFB₁ beteiligt; von Bedeutung sind die CYP1A-, 2B-, 2C- und 3A-Unterfamilien (Yoshizawa et al., 1982; Robertson, 1983).

Neben dem durch CYP katalysierten Hauptaktivierungsweg kann AFB₁ auch durch die Prostaglandinsynthase und die Lipooxygenase (Liu & Massey, 1992) epoxidiert werden.

Die Hydroxylierung am Cyclopentanonring in Position 3 α führt zur Bildung von AFQ₁, während AFM₁ durch Hydroxylierung am tertiären Kohlenstoff 9a entsteht. Dagegen wird AFP₁ infolge einer CYP-abhängigen O-Demethylierung gebildet. Während die Hydroxylierung zum AFQ₁ und AFM₁ beim Menschen ebenfalls durch CYP3A4 bzw. CYP1A2 katalysiert wird, ist noch nicht bekannt, welche CYP-Form(en) die AFP₁-Bildung katalysiert (Raney et al., 1992).

Aflatoxicol (AFL) ist ein weiterer Metabolit von Aflatoxin B₁, der durch eine NADPH-abhängige cytosolische Carbonylreduktase entsteht. (Roebuck & Wogan, 1977). Das so gebildete AFL wird durch die mikrosomale Dehydrogenase zum AFB₁ oxidiert. Es wird angenommen, daß durch diese Umkehrreaktion von AFL zu AFB₁ die Verweildauer von AFB₁ in empfindlichen Spezies verlängert wird (Salhab & Edwards, 1977). Interessanterweise wird in der Maus und im Affe, Tierspezies mit einer relativen Resistenz gegenüber der Toxizität von AFB₁, bevorzugt AFP₁ gebildet, während die empfindlichen Spezies wie die Ratte vermehrt Aflatoxicol bilden.

Abgesehen von AFL wird die Bildung von hydroxylierten Aflatoxinen wie AFQ₁, AFM₁ und AFP₁ als Detoxifizierungsreaktion betrachtet, da ihr mutagenes Potential im Vergleich zu AFB₁ sehr gering ist. Darüber hinaus sind diese hydroxylierten Aflatoxine

polarer als AFB₁ und werden weiter durch Phase II Enzyme glucuronidiert bzw. sulfatiert und damit der Ausscheidung zugeführt (Hsieh et al., 1984; Coulombe et al., 1982).

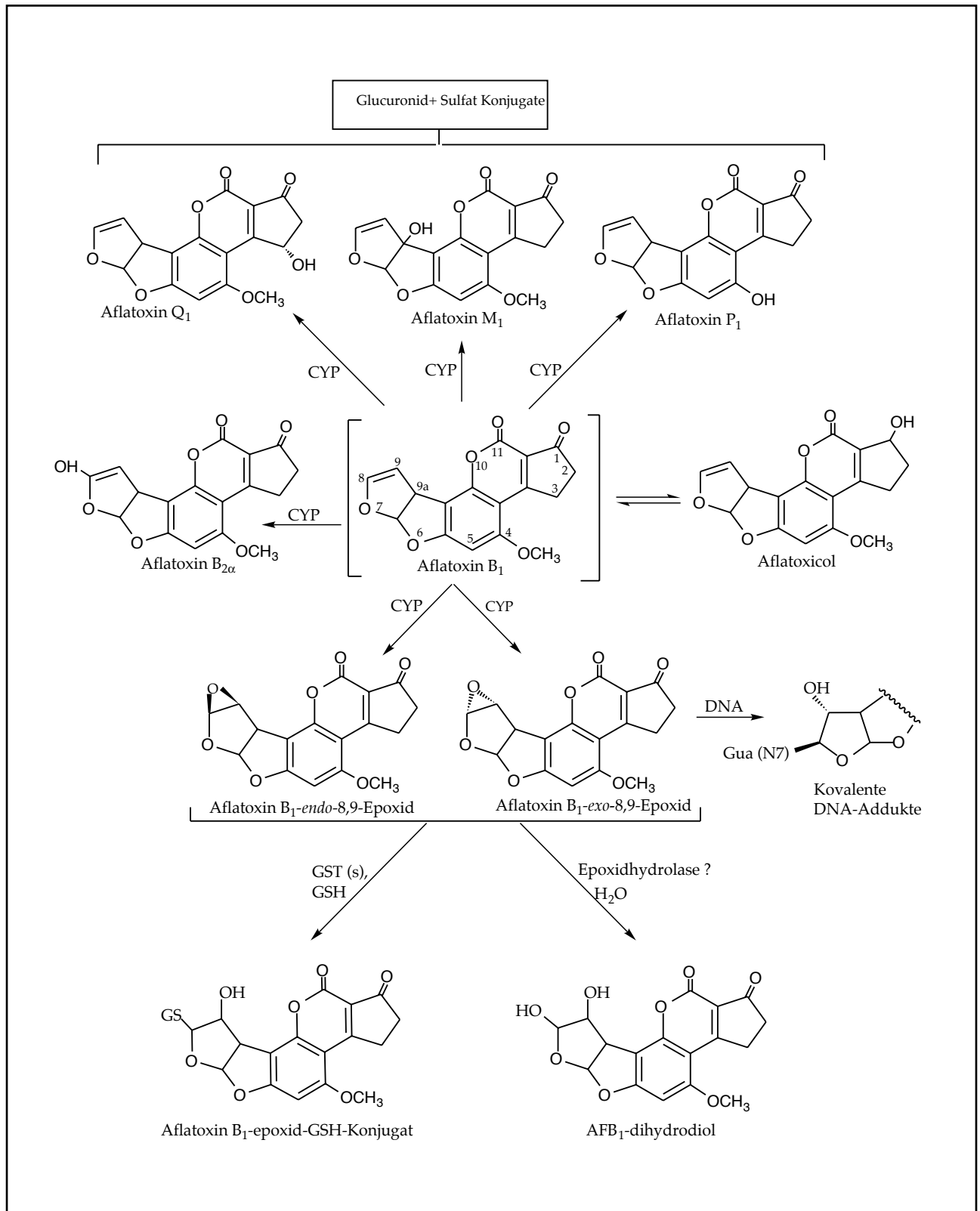


Abb. 1.4: Vereinfachte Darstellung des Metabolismus von AFB₁

Neben toxisierenden Enzyme wie CYP, die AFB₁ zu ultimalen Kanzerogen aktivieren, besitzt der Organismus detoxifizierende Enzyme wie GST, die bei der Entgiftung von AFB₁-8,9-Epoxid eine Schlüsselrolle spielen. Hierbei katalysiert die cytosolische GST den nukleophilen Angriff des Glutathions (GSH) an dem elektronenarmen AFB₁-8,9-Epoxid, das zu einer Thioetherbindung zwischen dem elektrophilen C-9 Atom des AFB₁-8,9-Epoxids und der Sulfahydrylgruppe des Glutathions führt. Damit stellt diese Biotransformationsweg (Abb. 1.4) einen alternativen Bindungspartner zur Verfügung, um die Zellen vor der gentoxischen und cytoxischen Wirkung von AFB₁-8,9-Epoxid zu schützen (Loltiker et al., 1984; Eaton et al., 1994).

Degen & Neumann (1981) vermuteten als erste, daß sich der Speziesunterschied zwischen Ratte und Maus in bezug auf die kanzerogene Wirkung von AFB₁ auf der Basis der Unterschiede in der Konjugationskapazität der GST bei den beiden Tierart erklären läßt. Inzwischen weiß man, daß die cytosolischen GST durch Expression mehrerer Klassen (α , μ , π , θ) (Hayes, 1991; Meyer 1991, Mannervik, 1985) und Untereinheiten gekennzeichnet sind, die wiederum ausgeprägte Unterschiede in der AFB₁-8,9-Epoxid-konjugierenden Kapazität aufweisen. So besitzen aus der α -Klasse die mGSTA3 der Maus (Hayes, 1991) und aus der μ -Klasse die rGSTA5 der Ratte (Gopalan, 1992) die höchste konjugierende Aktivität gegenüber AFB₁-exo-8,9-Epoxid, wobei jedoch die rGSTA5 (auch als Untereinheit 10-10 von μ -Klasse bekannt) nicht in Lebern von gesunden und unbehandelten adulten Ratten nachweisbar war (Hayes, 1990).

Wie Studien mit dem synthetisch hergestellten Gemisch von exo- und endo-8,9-Epoxid zeigten, sind die cytosolischen GST aus Humanleber weniger aktiv in ihrer Fähigkeit, das Epoxid zu inaktivieren als cGST aus der Rattenleber, obwohl wie bei der Ratte die μ -Klasse des Menschen im Vergleich zu anderen cGST-Genfamilie eine hohe Aktivität gegenüber AFB₁-8,9-Epoxid besitzt (Raney et al., 1992; Liu et al., 1988). Interessant erscheint hierbei, daß bei 50% der Menschen eine funktionell inaktive GST (GSTM1) existiert. Daher könnte für Individuen mit diesem genetischen Defekt ein erhöhtes Leberkrebsrisiko bei Exposition gegenüber AFB₁ vermutet werden (Stranger, 1993).

Neben der Konjugation mit GSH, die das AFB₁-8,9-Epoxid effizient detoxifiziert, existiert eine weitere Folgereaktion, die das Epoxid spontan oder durch katalytische Aktivität der mikrosomalen Epoxidhydrolase zum 8,9-Dihydro-8,9-dihydroxy-AFB₁ (AFB₁-8,9-dihydrodiol) überführt (Abb. 1.4).

Da AFB₁-dihydrodiol selbst keine DNA-bindende Eigenschaft besitzt, kann es als nicht-gentoxisches Produkt betrachtet werden. Allerdings handelt es sich bei dem intermediär gebildeten AFB₁-8,9-dihydrodiol chemisch um ein Halbacetal, das sich (enzymatisch oder spontan?) zum Aldehyd am C-8 öffnen kann. Der Aldehyd könnte dann mit Aminogruppen in Proteinen zu stabilen Schiffschen Basen reagieren. Das hierbei entstehende AFB₁-Protein-Bindungsprodukt wird für die akute cytotoxische Wirkung von AFB₁ verantwortlich gemacht (Judah et al., 1993).

Die Rolle der mEH bei der Umwandlung des AFB₁-8,9-Epoxids zum AFB₁-dihydrodiol *in vivo* ist noch unklar. Obwohl die mEH direkt am Bildungsort der AFB₁-8,9-Epoxid vorkommt, sprechen die bisherigen Befunde doch dafür, daß der durch cGST vermittelte Schutz gegenüber der gentoxische Wirkung des AFB₁-8,9-Epoxids die größere Bedeutung besitzt (Monroe & Eaton, 1987).

Darüber hinaus zeigte eine Untersuchung *in vitro*, daß die durch die mEH katalysierte Spaltung von AFB₁-*exo*-8,9-Epoxid zum AFB₁-dihydrodiol (damit Hemmung der AFB₁-DNA-Addukt-Bildung) im Vergleich zur spontanen Hydrolyse zum AFB₁-dihydrodiol nicht signifikant war. Dies wird damit begründet, daß das AFB₁-*exo*-8,9-Epoxid unter physiologischen Bedingungen eine extrem kurze Halbwertszeit aufweist (Johnson et al., 1996).

1.5 Primärer Leberkrebs als multifaktorielles Ereignis: Bedeutung der Aflatoxine und Hepatitis B-Virus Infektion

Primärer Leberkrebs ist weltweit eine häufige Krebsform mit unterschiedlicher geographischer Verteilung. Besonders häufig kommt er in Zentral- und Südafrika sowie in Südostasien vor. Hinsichtlich der geographischer Verteilung besteht in den oben genannten Ländern ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Aflatoxinen über kontaminierte Lebensmitteln und dem Auftreten von primärem Leberkrebs (Hall & Wild, 1994; Groopman et al., 1988).

Nach der IARC (International Agency for Research on Cancer) gibt es ausreichende Hinweise dafür, daß Aflatoxin B₁ als Kanzerogen der Gruppe 1 beim Menschen anzusehen ist (IARC, 1993). Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, daß in den Regionen mit hoher Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms (HCC) auch die durchschnittliche Aflatoxinaufnahme bei der Bevölkerung hoch ist. Darüber hinaus zeigte die Bestimmung von AFB₁-Biomarkern (AFB₁-Metabolite wie AFM₁ oder AFB₁-DNA-Addukte im Urin sowie AFB₁-Albumin-Addukte im Blut) einen signifikanten Unterschied zwischen Personen mit HCC und Kontrollpersonen.

Die hepatokanzerogene Wirkung von AFB₁ wurde auch in verschiedenen Versuchstierarten demonstriert (Wogan, 1973; Busby & Wogan, 1984), was die Aufklärung der Mechanismen im Tierversuch ermöglicht.

Auf molekularer Ebene ist der Zusammenhang zwischen einer AFB₁-Aufnahme und der Entstehung von Leberkrebs geklärt. Entscheidend hierbei war die Entdeckung, daß das durch CYP aktivierte AFB₁-8,9-Epoxid an das Guanin-N⁷ der DNA bindet und Mutationen auslöst (Swenson et al., 1977).

AFB₁ führt aufgrund seiner mutagenen Wirkung zur Aktivierung von Proto-Onkogenen und zwar verursacht das Mykotoxin Mutationen im Codon 12 aller drei ras-Onkogene (H-ras, N-ras K-ras) bei Ratten (McMahon et al., 1987). Ob beim Menschen auch derartige Mutationen in Leberkarzinomen auftreten, ist nicht bekannt.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die kanzerogene Wirkung von AFB₁ besteht darin, daß es Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 hervorrufen kann. Für die Entstehung von HCC scheint die Punktmutation am dritten Nukleotid des Codons 249 eine wichtige Rolle zu spielen. Bei dieser Mutation wird Guanin durch Thymin ersetzt (GT-Transversion), wodurch im entstandenen Protein statt der basischen Aminosäure Arginin die neutrale Aminosäure Serin steht (Bressac et al., 1991; Hsu et al., 1991).

Im normalen Zustand kontrolliert p53 im Zellzyklus den Eintritt in die Phase der DNA-Synthese. Dabei hemmt p53 das Wachstum und die Teilung von Zellen mit genetischen Defekten, wodurch die Reparaturenzyme der Zellen Zeit gewinnen, die DNA-Schäden zu beseitigen. Neuere Studien haben gezeigt, daß das vom Wildtyp des p53 -Gens kodierte Tumorsuppressorprotein p53 bei Zellen mit DNA-Defekten ein programmiertes Absterben (Apoptose) bewirkt (Gottlieb et al., 1996).

Ein anderer Faktor, den man für die Entstehung des primären Lebertumors verantwortlich macht ist, die chronische Infektion mit Hepatitis B-Virus (HBV). Durch epidemiologische Studien läßt sich ein Zusammenhang zwischen HBV und HCC nachweisen. So wurde beispielsweise gezeigt, daß chronische Virusträger gegenüber nicht infizierten Personen ein 200-fach höheres Risiko haben, an einem Leberzellkarzinom zu erkranken.

Die epidemiologischen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HBV und HCC wurden durch tierexperimentelle Untersuchungen an Walddarmeltieren, einem Tiermodell für das humane HCC, gestützt (Fourel et al., 1990; Gerin et al 1989).

Auf molekularer Ebene ist der Mechanismus der HBV-Infektion und der Entwicklung des HCC bisher noch ungeklärt. In HBV-induzierten humanen HCC findet man auffälligerweise in fast allen Tumorgeweben in das Genom der Wirtszelle integrierte virale

DNA, wobei der Integrationsort auf dem menschlichen Genom zufällig zu sein scheint. Unabhängig davon wird die Möglichkeit diskutiert, daß es durch Integration der HBV-Sequenzen zur Chromosomeninstabilität kommen könnte. Die Folge wäre die verstärkte Aktivierung eines Protoonkogens bzw. Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens mit daraus resultierendem unkontrolliertem, malignem Zellwachstum (Tokino et al., 1987, Hino et al., 1991).

Neuerdings wird von vielen Forschern postuliert, daß virale Genprodukte direkt als auslösender Faktor der Kanzerogenese in Frage kommen. Die tierexperimentellen Daten zeigen, daß das virale Transaktivatorprotein HBx die Transkription einer Vielzahl zellulärer Onkogene (c-fos, c-myc) verstärkt (Balsano et al., 1991). Diskutiert wird die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorgens p53 durch HBx. Hierbei wurde experimentell gezeigt, daß das virale Protein an das Wildtyp-p53 komplex bindet, was die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens zur Folge hat (Kim et al., 1991).

Neben dem oben ausgeführten molekularen Mechanismen der Pathogenese des HCC wird eine indirekte Rolle des HBV postuliert. So könnte es nach viraler Infektion als Folge der Immunreaktion zur chronischen Entzündung und demzufolge zur gesteigerten Zellregeneration und zur unkontrollierten malignen Zellvermehrung kommen (Dusford et al., 1990).

Eine virale Infektion ist oftmals von einer systemische Reaktion des Organismus begleitet, die unter anderem zu einer Erhöhung der Akute-Phase Proteine führt. Hierbei werden in den Hepatozyten eine Vielzahl von Cytokinen synthetisiert. Zu diesen gehören Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren, der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und der Transforming-Growth-Faktor β_1 (TGF- β_1). Einige dieser Cytokine wirken pro-inflammatorisch während die anderen durch cytotoxische Mechanismen die infizierten Hepatozyten abtöten, was wiederum das regenerative Wachstum fördert. Andererseits könnten große Mengen von Wachstumsfaktoren einen wachstumsfördernden Einfluß auszuüben.

Für Menschen aus Ländern mit hoher Aflatoxinverunreinigung der Nahrung ist die hohen Rate von HBV-Infektionen von beträchtlicher praktischer Bedeutung, da ja das Zusammenwirken beider Faktoren zu einer synergistischen Interaktion und somit zu einer deutlich erhöhten Frequenz der Entwicklung eines HCC führt. Dies wurde zum Beispiel durch molekular-epidemiologischen Untersuchungen an einer großen Studie in China nachgewiesen (Ross et al., 1992). Daraus wurde eine Risikoabschätzung abgeleitet. Dabei wurde das Risiko für ein HCC ohne erkennbaren Risikofaktor gleich 1 angesetzt. Das Risiko für ein HCC nach Einwirkung von AFB₁ erhöht sich nach dieser

Berechnung auf 2, es betrug 5 bei HBV-Antigen Positivität ohne AFB₁-Exposition und stieg auf 60 bei einer gleichzeitigen HBV-Antigen Positivität und AFB₁-Exposition.

Die synergistische Interaktion beider Faktoren wurde auch tierexperimentell in Waldmurmeltieren (Bannasch et al., 1994) und in transgenen HBV-Mäusen (Sell et al., 1991) demonstriert.

Auf molekular Ebene wurde bei zahlreichen Fällen von HCC, Mutation des p53-Gens beobachtet. Zunächst wurde von vielen Forschern angenommen, daß das bei der HCC beobachtete p53-Genmutation am Codon 249 (AGG→AGT) den gemeinsamen Muster der AFB₁- und HBV-Exposition darstellen könnten. Neuerdings zeigt sich jedoch, daß die p53- Mutation am Codon 249, wie sie typischerweise für viele chinesischen und afrikanischen Fälle von HCC beschrieben wurde, bei Patienten aus Regionen mit niedrigeren AFB₁-Exposition extrem selten ist. Andererseits findet man die p53-Genmutation am Codon 249 sowohl bei HBsAg-positiven als auch bei HBsAg-negativen Patienten (IARC, 1993). Daher spricht vieles dafür, daß an der p53-Genmutation am Codon 249 eher die hohe Aflatoxinexposition beteiligt ist als die HBV-Infektion, da die p53 Genmutation sowohl bei HBsAg-positiven als auch bei HBsAg-negativen Patienten nachweisbar war (Buetow et al., 1992). Außerdem ließ sich bei einer experimentell induzierten HCC (HBV-Infektion und gleichzeitige Behandlung mit AFB₁) eine derartige Mutation nicht bestätigen (Rivkina et al., 1996).

Während die Interaktion zwischen HBV und AFB₁ in der Pathogenese des HCC zumindest in Versuchstieren bewiesen ist, gibt es für diesen synergistischen Effekt keine plausible Erklärung.

1.6 Aufbau der Leber und Leberzellsubpopulationen

1.6.1 Aufbau der Leber

Die Leber als das größte und vielseitigste Stoffwechselorgan besitzt eine zentrale Bedeutung im menschlichen Körper. Sie ist das wichtigste Organ für den Intermediärstoffwechsel der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide sowie für die Biotransformation von Fremdstoffen.

Äußerlich unterteilt man die Leber in Lappen, aber als Feinbaueinheit der Leber gilt das Leberläppchen (Lobulus hepatis). In seiner Mitte enthält es die Zentralvene (Abb. 1.5). Innerhalb dieser Läppchen sind die Leberzellbalken (Platten), die aus ein bis zwei Schichten von Leberparenchymzellen (Hepatozyten) gebildet werden, radiär angeordnet. Zwischen diesen Platten befinden sich die Sinusoide, die das Blut von den

Ästen der Pfortader und Leberzellarterie zur Zentralvene des Läppchens leiten. Die Wände der Sinusoide werden von den lose gefügten, fenestrierten Endothelzellen gebildet. Der Spalt, der sich zwischen Leberzellplatten und dem Endothel der Sinusoidwand befindet, wird als Disse'scher Raum bezeichnet. Im Verband der Endothelzellen liegen die Kupffer-Sternzellen. Sie können aber auch den Endothelverband verlassen, um in die Sinusoide oder den Disse'schen Raum einzuwandern. Im Disse'schen Raum befinden sich außerdem die Ito- und Pit-Zellen.

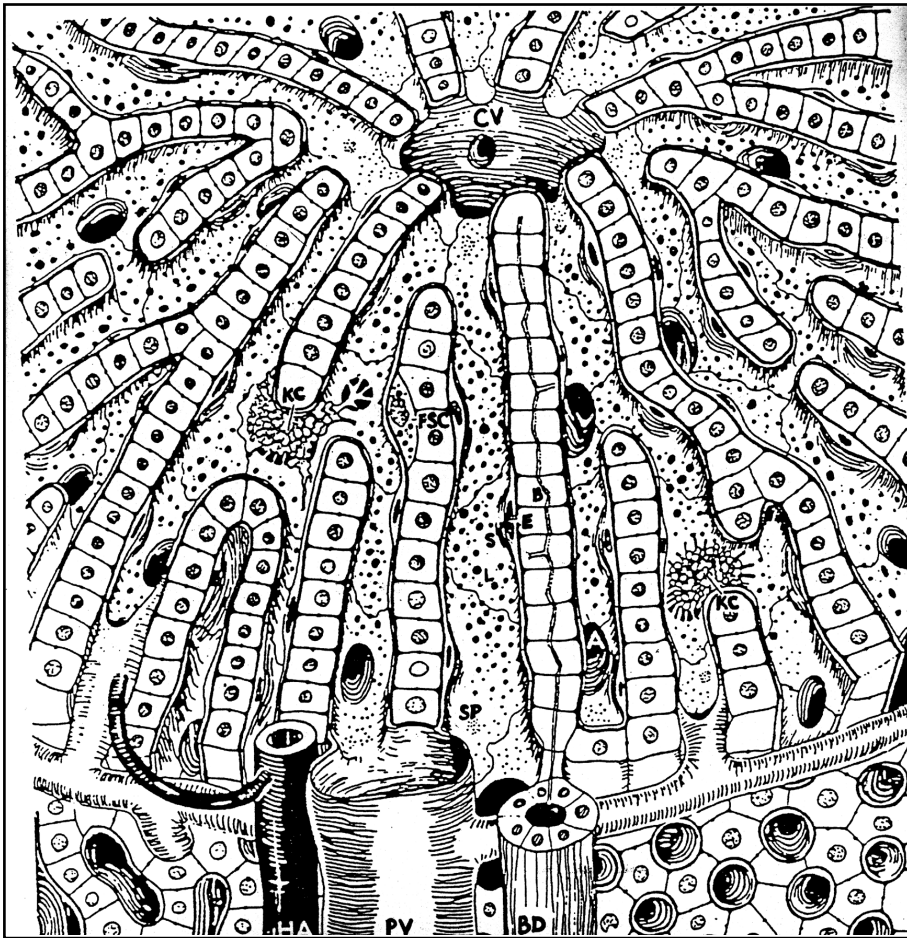


Abb. 1.5: Dreidimensionale Darstellung zur Anordnung und Struktur der Leberzellen. B- Gallenkapillare; **BD-** Gallengang; **CV-** Zentralvene; **E-** Endothelzellen; **FSC-** Itozellen; **HA-** Ast der Leberarterie; **KC-** Kupfferzelle; **PV-** Ast der Pfortadervene; **S-** Sinusoid.

Im Gegensatz zu der oben geschilderten Gliederung in Leberläppchen ist für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge die Unterteilung in Acini von Vorteil. Hierbei gilt der Leberacinus als strukturelle, zirkulatorische und funktionelle Einheit der Leber. In seiner Mitte enthält es das portale Gefäßbündel, bestehend aus Arteria hepatica, Vena portae und Gallengang. Die Peripherie des Acinus bilden die Zentral-

venen. Je nach der Nähe zu den Blutgefäßen wird eine topographische Gliederung in drei zirkulatorische Zonen unterschieden: periportal (Zone 1), intermediär (Zone 2) und perivenös oder zentrilobulär (Zone 3), denen verschiedenen Stoffwechselschwerpunkte zugeordnet werden. So werden die Zellen der periportal Zone mit einer größeren Menge an Sauerstoff, Hormonen und Nährstoffen versorgt als die Zellen in der sauerstoffarmen zentrilobulären Region. Der oxidative Energiemetabolismus findet vorwiegend in der periportal Zone statt, während viele für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlichen Cytochrom P450 Enzyme in der zentrilobulären Region lokalisiert sind. Morphologisch sind die zentrilobulären Zellen größer und in ihrer Ultrastruktur zeichnen sie sich durch zahlreichere, aber kleinere Mitochondrien und eine erhöhte Anzahl von Lysosomen und Peroxisomen gegenüber Zellen aus dem periportal Bereich aus.

1.6.2 Die Leberzellsubpopulationen

Die Leber besteht aus verschiedenen Zelltypen, von denen die Parenchymzellen (PC) oder auch Hepatozyten genannt, die am stärksten vertretene Zellpopulation sind. 90% des Zytoplasmavolumens der Leber und 65% der Zellzahl entfallen auf Hepatozyten. Die anderen Zellen sind Sinusoidalzellen, zu denen Kupffersche Sternzellen und Endothel-, Ito- und Pit-Zellen gehören. Die Zellen der Gallengänge und des Bindegewebe machen 4% aller Zellen der Leber aus (Weibel, 1969; Arias et al., 1988; Sasse, 1986).

Die Leberparenchymzellen (PC) sind überdurchschnittlich reich an endoplasmatischem Retikulum, Peroxisomen und Mitochondrien. Die PC sind polygonal, im Durchmesser etwa 20-30 μm groß und haben einen, teils mehrere Zellkerne, die im Zentrum der Zelle lokalisiert sind. Die Stoffwechselleistung der Leberparenchymzellen umfaßt eine Fülle verschiedener Funktionen, die dem Kohlenhydrat-, Protein-, Lipid-, Lipoprotein-, Gallensäure-, Porphyrinstoffwechsel sowie der Biotransformation endogener und exogener Stoffe zugeordnet werden können.

Die Nichtparenchymzellen (NPC), die auch als sinusoidale Zellen bezeichnet werden, machen ca. 30% der Gesamtzahl der Leberzellen aus. Die NPC sind charakterisiert durch ihre Lage an Sinusoiden, wo sie in den Blutstrom zwischen den Hepatozyten hineinragen. Hierdurch können sie als erste mit dem zirkulierenden Blutstrom und den

darin enthaltenen Stoffe in Wechselwirkung treten. Morphologisch sind die NPC kleiner als PC und stellen somit nur 2-10% des Gesamtproteingehalts der Leber dar. Zu den NPC gehören hauptsächlich Kupfer- und Endothelzellen, aber auch Ito- und Pit-Zellen.

1.6.3 Morphologie und Funktion der Nichtparenchymzellen

Die Kupferzellen der Ratte haben einen Durchmesser von 8,7–9,1 μm und ein Volumen von 340-400 μm^3 . Sie bilden nur 2,3% des Gesamtzytoplasmas der Leber, enthalten aber eine größere Anzahl von Lysosomen als Parenchymzellen. Die Kupferzellen machen mit rund 70 bis 80% die größte Makrophagenpopulation des Organismus aus. Hauptaufgabe der Kupferzellen ist die Aufnahme verschiedener Makromoleküle und Partikel aus dem Blut sowie deren Abbau. Dafür stehen den Zellen vermutlich verschiedene Endozytosemechanismen zur Verfügung (Wisse & Knook, 1977). So werden Partikel, die $> 0,1 \mu\text{m}$ sind nur von Kupferzellen, nicht aber von Endothelzellen aufgenommen. Insbesondere können die Kupferzellen wegen ihres Enzymreichtums intrazelluläre Bakterien, Parasiten und Zelltrümmer phagozytieren, Entzündungsmediatoren sezernieren und intrazellulär zersetzen (Wisse & Knook, 1977). Eine weitere Funktion der Kupferzellen liegt in ihrer Fähigkeit, die Erythrozyten abzubauen und mit der Galle auszuscheiden. Unterscheidungsmerkmal der Kupferzellen gegenüber allen anderen Leberzellen ist die Peroxidaseaktivität, die für ihre Identifizierung ausgenutzt wird (Fahimi et al., 1976).

Die Endothelzellen der Ratte haben einen Durchmesser von 7 μm und ein Volumen von 130 μm^3 . Sie stellen von ihrem Gesamtplasmavolumen her die größte Fraktion der Sinusoidalzellen dar. Sie enthalten reichlich Lysosomen und Pinozytosevesikel und synthetisieren α -Actin, Myosin, f-Actin und Kollagen. Die Endothelzellen besitzen Poren (Fenestrae) mit einem Durchmesser von 0,1-1,0 μm . Diese Öffnungen bilden in Gruppen die sogenannten Siebplatte, die den Kontakt der Zellen im Perisinusoidalraum (Disse'scher Raum) sowie der Parenchymzellen mit größeren Partikeln im Blut verhindert. So können z. B. intakte Chylomikronen und "very low density lipoproteins" aus der Pfortader diese Barriere nicht passieren (Brouwer et al., 1988). Durch Kontraktion und Dilatation der Poren erfolgt der Blutaustausch zwischen den Sinusoiden und dem Disse'schen Raum, wobei die Porenweite durch Calcium und Calmodulin reguliert wird (Arias et al., 1988). Weitere Aufgaben der Endothelzellen könnten die

Virusabwehr, die Interaktion mit Tumorzellen und der Abbau der Glykosaminoglykane sein. Die entzündliche Lebererkrankung (Hepatitis) führt zur Proliferation der Endothelzellen (David et al., 1987).

Die Ito-Zellen, die auch als Fettspeicherzellen, perisinusoidale Zellen, Lipozyten oder interstitielle Sternzellen bekannt sind, befinden sich im Disse'schen Raum meist zwischen zwei Parenchymzellen. Der Durchmesser der Ito-Zellen beträgt 7-12 μm . Das auffallendste Merkmal der Ito-Zellen sind die Fetttropfchen. Die Fetttropfchen enthalten reichlich Vitamin A, so daß die Ito-Zellen den Hauptspeicher für Vitamin A in der Leber darstellen; vermutlich sind sie am Vitamin-A-Stoffwechsel beteiligt (Wake, 1980). Eine weitere Eigenschaft der Ito-Zellen besteht in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Kollagen Typ I, II und IV, Proteoglykanen, Laminen und Fibronektin. Es wird diskutiert, daß die Ito-Zellen gemeinsam mit den Parenchymzellen für die Abgabe von Matrixsubstanz in den Disse'schen Raum verantwortlich sind und damit bei der Pathogenese der Leberfibrose und -zirrhose eine wichtige Rolle spielen.

Neben Kupffer- Endothel- und Ito-Zellen gehören auch die Pit-Zellen zu den Sinusoidalzellen. Diese Zellen liegen im Disse'schen Raum und haben eine enge Beziehung zur Sinusoidalwand. Über ihre Funktion vermutet man, daß sie wegen ihrer lymphozytenartigen Eigenschaft an der Immunabwehr beteiligt sind.

1.6.4 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme in verschiedenen Leberzelltypen

Während die fremdstoffmetabolisierende Kapazität der PC bereits intensiv untersucht wurde, ist die Rolle der NPC bei der Aktivierung und Detoxifizierung von kanzerogenen Substanzen wenig bekannt. Untersuchungen am Institut für Toxikologie der Universität Mainz und von anderen Arbeitsgruppen haben zum Nachweis der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme nicht nur in PC sondern auch in NPC der Rattenleber geführt (Lafranconi et al., 1986; Steinberg et al., 1987; Rich & Lodola, 1987). Dabei weisen die Parenchymzellen im Vergleich zu Kupffer- und Endothelzellen den höchsten Gehalt und Aktivitäten an der Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen auf, während die beiden Zelltypen der NPC relativ höhere Aktivitäten der Phase II Enzyme besitzen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Biotransformation von AFB₁ unter Berücksichtigung verschiedener Fragestellungen untersucht werden.

Die Behandlung von Ratten mit dem Mykotoxin Aflatoxin B₁ führt zu Lebertumoren hepatozellulären Ursprungs, jedoch nicht zu Tumoren, die von Kupffer- oder Endothelzellen ausgehen. Wie Leberparenchymzellen können auch Nichtparenchymzellen sowohl polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als auch Aflatoxin B₁ zu mutagenen Metaboliten aktivieren. Darüber hinaus werden sowohl in vivo als auch in vitro in Kupffer- und Endothelzellen nach der Behandlung mit Aflatoxin B₁ entsprechende DNS-Adukte gefunden. Noch nicht geklärt ist die Frage nach den möglichen Schutzmechanismen der Kupffer- und Endothelzellen gegenüber der genotoxischen Wirkung von Aflatoxin B₁.

Diese Resistenzmechanismen der verschiedenen Leberzelltypen gegenüber AFB₁ sollten im ersten Teil der Arbeit untersucht werden. Hierbei war zu klären, ob die zelltypspezifischen Resistenz gegenüber AFB₁ auf einer unterschiedlichen Aktivierungs- bzw. Detoxifizierungskapazität der beiden Zelltypen, PC bzw. NPC, beruht. Die Methodik besteht in der Isolierung der PC und NPC aus der Rattenleber, Inkubation mit AFB₁ und nachfolgender Analyse der gebildeten Metabolite mit Hilfe der HPLC.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß die HBV-Infektion und die Kontamination von Lebensmitteln mit AFB₁ eine große Rolle bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms spielen. Insbesondere für die subtropischen und tropischen Regionen Afrikas und Asiens konnte ein Synergismus zwischen AFB₁ und HBV nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, daß bei gleichzeitigem Vorliegen einer HBV-Infektion und einer AFB₁-Exposition die Wahrscheinlichkeit, an einen primären Leberkrebs zu erkranken, um den Faktor 10-30 größer ist, als beim Vorhandensein nur eines der beiden Risikofaktoren. Die molekularen Grundlagen dieser Interaktion sind jedoch unbekannt. Daher wird im zweiten Teil dieser Arbeit an zwei Tiermodelle für die chronische Hepatitis B-Virus Infektion untersucht, ob die dabei auftretende Leberentzündung die Biotransformation von AFB₁ verändert. Insbesondere soll geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß das ultimate reaktive Kanzerogen sowie detoxifizierte Metabolite gebildet werden. Zur qualitativen und quantitativen Analyse des AFB₁ Metabolismus soll die HPLC eingesetzt werden. Daneben soll mit

unterschiedlichen diagnostischen Substrate die Aktivität verschiedene CYP-Enzyme bestimmt werden.

Parallel dazu wird geprüft, ob TGF- β_1 , eines der Cytokine, die bei der Entzündungsreaktion in der Leber freigesetzt wird, die Expression von bestimmter Cytochrom-P450-Formen beeinflusst. Ziel dieses dritten Teils der Arbeit ist, in Primärkulturen von Maushepatozyten zu untersuchen, ob TGF- β_1 die Expression des murinen CYP2A5 (homolog zu CYP2A6 des Menschen) beeinflusst. Dieses CYP-Isoenzym ist sowohl bei der Maus als auch im Menschen zusammen mit anderen CYP-Formen maßgeblich an der hepatischen Aktivierung von AFB₁ zu gentoxischen Metaboliten beteiligt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acetonitril für HPLC	Promochem, Wesel
Aflatoxin-B ₁ , -G ₁ , -M ₁ , -Q ₁ und -P ₁	Sigma, Deisenhofen
[G- ³ H]Aflatoxin B ₁	Moravek, Brea, USA
Ammoniumacetat für HPLC	Backer, Groß-Gerau
4-Androsten-3,17-dion	Sigma, Deisenhofen
Aroclor 1254	Bayer, Leverkusen
Butyl-Hydroxyanisol	Sigma, Deisenhofen
Corticosteron	Sigma, Deisenhofen
Cumarin	Sigma, Deisenhofen
Collagenase (EC 3.4.24.3)	Boehringer/Serva
1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol	Sigma, Deisenhofen
Ethoxycoumarin	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Titrplex®III)	Merck, Darmstadt
Glucose-6-phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase- Lösung (E.C.1.1.149)	Boehringer, Mannheim
Glutathion (reduziert)	Sigma, Deisenhofen
Isosafrol	Janssen, Geel, Belgien
Methanol für die HPLC	Merck, Darmstadt
3-Methylcholanthren	Fluka, Buchs, CH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdithionit	Merck, Darmstadt
Nycodenz	Oslo, Norwegen
Pentobarbital-Natrium	Synopharm, Barsbüttel
Phenobarbital	Synopharm, Barsbüttel
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Styroloxid	Merck, Darmstadt
[7- ³ H]Styroloxid	Amersham, Buchler, Braunschweig
Testosteron	Sigma, Deisenhofen
16 β-, 6β-, 16α-, 7α-Hydroxytestosteron	Paesel, Frankfurt/M
6α-, 19-, 15β-, 11β-, 2α-, 2β-Hydroxytestosteron	Schering AG, Berlin
Tetrahydrofuran für HPLC	Roth, Karlsruhe

Alle anderen laborüblichen Chemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad (p.a.) von folgenden Firmen bezogen:

Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen; Roth, Karlsruhe; Riedel-de-Haen, Seelze

2.1 Häufig verwendete Stammlösungen und Puffer

Aminosäure-Lösungen (pH 7,6) :

L-Alanin	0,27 g/l	L-Lysin	1,30 g/l
L- Asparaginsäure	0,14 g/l	L-Methionin	0,55 g/l
L- Asparagin	0,40 g/l	L-Ornithin	0,65 g/l
L-Citrullin	0,27 g/l	L-Phenylalanin	0,55 g/l
L-Citrullin	0,27 g/l	L-Prolin	0,55 g/l
L-Cystein	0,14 g/l	L-Valin	0,80 g/l
L-Histidin	1,00 g/l	L-Serinn	0,65 g/l
L-Glutaminsäure	1,00 g/l	L-Threonin	1,35 g/l
L-Glycin	1,00 g/l	L-Tryptophan	0,65 g/l
L-Isoleucin	0,40 g/l	L-Tyrosin	0,55 g/l
L-Leucin	0,80 g/l		

Aminosäure (Sigma) in ca. 950 ml H₂O aufnehmen und 10 min rühren; dann durch Zugabe von 4 N NaOH alle Aminosäure zum lösen bringen. Danach mit 20% HCl auf pH 7,6 einstellen und das Endvolum mit H₂O auf 1000 ml auffüllen.

EGTA (Ethylenglykol bi-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure)-Lösung (0,125M): (Sigma) mit einigen Tropfen von 2 N NaOH auf pH 7,4 einstellen.

GBSS (Gey's Balanced Salt Solution) pH 7,5:

Eine wässrige Lösung mit 136,9 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,28 mM MgSO₄ x 7H₂O, 1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM CaCl₂ x 2H₂O, 0,22 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O, 2,7 mM NaHCO₃, 5 mM D-Glucose herstellen und mit 4 N NaOH auf pH 7,5 einstellen.

Glucose-Lösung:

9,0 g D-Glucose x H₂O (Roth) ad 1000 ml H₂O

L-Glutamin-Lösung:

0,7 g L-Glutamin (Sigma) ad 100 ml H₂O

HBSS-Lösung (Hank's Balanced Salt Solution) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ :

Wässrige Lösung mit 136,9 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,36 mM Na₂HPO₄ und 5,1 mM D-Glucose x H₂O

HEPES-Puffer (0,25M):

Eine wässrige Lösung 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (Sigma) mit konz. NaOH auf pH 7,6 einstellen.

Kalziumchlorid-Lösung (0,17M):

1,9 g CaCl₂ x H₂O (Merck) in 100 ml H₂O lösen

Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,6 (10 x):

1,2 M NaCl, 23,5 mM KCl und 11,8 mM KH_2PO_4 in 1000 ml H_2O lösen und mit 4 N NaOH auf pH 7,6 stellen.

Natriumphosphat-Puffer (0,5 M, pH 7,4):

Eine wässrige Lösung mit 0,5 M Na_2HPO_4 vorlegen und mit 0,5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf pH 7,4 stellen.

Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 3,0):

Eine wässrige Lösung $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,1 M) mit phosphosäure auf pH 3,0 erstellen.

Natriumphosphatpuffer (0,1M, pH 7,0):

Eine wässrige Lösung von Na_2HPO_4 (0,1 M) vorlegen und mit 0,1 M Lösung von $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf pH 7,0 stellen.

KCl-Lösung, isotonisch, pH 7,4 :

150 mM KCl in 10 mM Natrium Phosphatpuffer pH 7,4

Natriumhydrogencarbonat-Lösung (7,5%):

7,5 g NaHCO_3 ad 100 ml H_2O ; sterilfiltrieren.

PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} :

Eine wässrige Lösung mit 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 6,5 mM Na_2HPO_4 mit 2N NaOH auf pH 7,4 einstellen.

TRIS-HCl-Puffer, pH, 7,4:

Eine wässrige Lösung von 0,5M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan mit konz. HCl auf pH 7,4 stellen

TBE-Puffer (10 x):

Autoklavierte wässrige Lösung mit 89 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 89 mM H_3BO_3 und 20 mM EDTA (pH 8,0)

Trypanblau-Lösung:

Trypanblau (0,4 5) in PBS-Puffer lösen und durch 0,45 μm -Filter (Millipore) filtrieren.

TBS (TRIS gepufferte salzlösung)-Puffer (pH 7, 4):

Eine wässrige Lösung mit 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 154 mM NaCl und mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen.

TE-Puffer:

Autoklavierte wässrige Lösung mit 10 mM Tris/HCl (pH, 8,0) & 1 mM EDTA (pH 8,0)

Enzyme und Antikörper:

Monoclonale anti-Rat CYP2C11 (NatuTec, Frankfurt/M)

Alkalische Phosphatase konjugierte Rabbit Anti-Mouse IgG (Sigma, Deisenhofen)

Polyclonale Maus IgG gerichtet gegen Maus CYP2A5 (Chicken anti-Maus IgG) wurde freundlicherweise von Dr. Risto Juvonen Department of Toxicology, University of Kuopio, Finland zur Verfügung gestellt.

Alkalische Phosphatase konjugierte Rabbit Anti-Chicken IgG (Sigma, Deisenhofen).

AFB₁-8,9-Epoxid und seine GSH-Konjugat synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. A. Seidel, Dr. H. Frank und Dr. H. Kroth, Institut für Toxikologie, Universität Mainz, Mainz.

2.3 Verwendete Geräte

Außer den üblichen Laborgeräten wurden die folgenden Geräte benutzt:

Zur Trennung der Metabolite des Testosterons stand eine Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC) Anlage 1 (Waters, Eschborn) zur Verfügung.

Sie bestand aus:

- automatischer Probengeber Modell 712 WISP,
- zwei Hochdruckpumpen Modell 510,
- UV-Detektor Modell 484
- Schreiber/Integrator Modell 745

Zur Trennung von AFB₁-Metabolite mittels HPLC wurde Anlage 2 eingesetzt. Sie bestand aus:

einer Doppelkolben-Pumpe mit Gradientenmischer und Kontrolleinheit (SP 8700 solvent delivery system, (ehmalige Specta Physics, jetzt Thermo Separation Products-TSP, Darmstadt). Die Proben wurden aus Kapillarschleifen über ein Hochdruckinjektionssystem (C6U, Valco, Schenken, Schweiz) auf die Säule gegeben.

einer angeschlossenen LKB 2140 Dioden Array Detektor mit LKB 2146 Wavescan EG-Software Version 1.02 und Nelson Chromatography als Software-programm (Pharmacia, Freiburg).

Fraktionssammler für die Chromatographie:

LKB 2112 Radirac Fraction Collector (LKB/Pharmacia, Freiburg)

Spektrophotometer:

MPS-2000 UV/VIS-Spektrophotometer (Zweistrahl) mit Graphikprinter PR-3 (Schimadzu, Düsseldorf)

(UV/VIS-Spektrophotometer DU[®] 64(Beckman Instruments, München)

Spektrofluorometer:

Zweistrahl UV/VIS-Spektrophotometer f-2000 (Hitachi, Tokio, Japan über Colora, Lorch) Perkin-Elmer 650-40

Ultraschallgeräte:

Sonifier: Branson Ultrasonics Cell Disruptor Typ B15 Modell 250/450 Sonifier®
(Heinemann, Schwäbisch-Gmünd)

Ultraschallbad: Sonorex Bandelin PK 102 P (Bandelin, Berlin)

Szintillationszähler:

Packard Tri-carb® 300 Liquid Scintillation System Canberra Packard,
Frankfurt/M.)

Lyophilisation:

Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) mit Drehschieber-
Vakuumpumpe: RS15, Wertheim/Main)

Mikroskop:

Phasenkontrast Mikroskop, Diavert mit Auflichtilluminator Ultrapack, Nikon
Model TMS-F, Japan

Phasenkontrast Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung: Nikon`s Microphot-FXA
microscope system, Japan

Elektrophorese:

Polyacrylamid-Gelelektrophoreseapparaat (Typ Protean) (BioRAD, München)

Blottingkammer (BioRAD, München)

Agarosegelkammer (Werkstatt des Instituts)

Netzgerät: Electrophoresis Powersupply Phero-stab. 500,

(Biotech-Fischer, Reiskirschen)

Schüttler, (Heidelph, Unimax 2010)

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge Modell L5 50 bzw. L5 65 mit Rotor 60 Ti (Beckman
Instruments, München) zur Trennung der mikrosomalen und cytosolischen
Zellfraktionen.

Kühlzentrifuge: RC2-B, mit Rotor SS 34, DuPont (Bad Homburg)- zur
Präparation der S-9 Fraktion aus Zell- oder Leberhomogenat.

Zentrifuge Sigma 3K12 zur Aufarbeitung der Parenchym- und
Nichtparenchymzellen

Zentrifuge 4K10 (Braun, Melsungen) und Biofuge 13 (Heracaus, Osterode)
zur Aufarbeitung der Inkubationsansätze.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Induktionsbedingungen

Männliche Sprague-Dawley Ratten, mit einem mittleren Körpergewicht von 280 g (Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen) wurden zu viert in Plastikkäfigen mit Drahtaufsatz bei einem konstanten 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei einer Raumtemperatur von 22 °C gehalten. Standardfutter 1000 (Altromin, Lage) und Trinkwasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Männliche C57BL/6 Mäuse, 18-25 g (Charles River Wiga, Sulzfeld) sowie DBA/2 Männliche Mäuse, 18-22 g (Charles River Wiga, Sulzfeld) wurden jeweils zu fünf, wie oben beschrieben gehalten. Vor der Verwendung wurden alle Tiere mindestens drei Tage im Tierstall zur Akklimatisierung gehalten.

weibliche CD-1 Mäuse, 31-35 g (Charles River Wiga, Sulzfeld) wurden jeweils zu fünf in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die Kontrollgruppe als Futter Altromin 1000 erhielt, während die BHA-Gruppe mit 0,75% (w/w) Butyl-Hydroxyanisol (BHA) -haltigem Altromin 1000 für 10 Tage gefüttert wurden.

Zur Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in der Leber wurden männliche Sprague-Dawley Ratten folgendermaßen vorbehandelt:

1. Phenobarbital Natrium : Phenobarbital-Natrium (80 mg/kg Körpergewicht in isoton. Kochsalzlösung (2,5 ml/Kg) 3 intraperitoneale Injektionen (i.p.) und zwar drei, zwei und einen Tag vor der Leberentnahme.
2. 3-Methylcholanthren: 25 mg/kg Körpergewicht in Sonnenblumenöl (2,5 ml/kg an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p., Leberentnahme am 4.Tag
3. Isosafrol: 150 mg/kg Körpergewicht in Sonnenblumenöl an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p., Leberentnahme am 4.Tag
4. Aroclor 1254: 500 mg/kg Körpergewicht in Sonnenblumenöl einmalig i.p. am 5. oder 6.Tag vor der Leberentnahme.

3.2 Isolierung der Leberparenchymzellen

Parenchymzellen wurden nach dem von Seglen (1973) eingeführten und später von Glatt et. al (1981) modifizierten Verfahren aus der Leber isoliert. Dabei wurde ein zweistufiges nicht-rezirkulierendes Verfahren verwendet, wobei bei dem ersten Schritt die Leber mit einem Ca^{2+} -freien Puffer, der EGTA als Ca^{2+} Komplexbildner enthält, perfundiert wird. Die Entfernung der Ca^{2+} Ionen trägt dazu bei, das Lebergewebe leichter zu dissoziieren, da Ca^{2+} bei der Zell-Zell Adhäsion eine wesentliche Rolle spielt. In einem zweiten Schritt erfolgte die Perfusion mit Collagenase-Puffer, der eine

enzymatische Verdauung des Kollagens im Lebergewebe und damit die Gewinnung von einzelnen Leberzellen ermöglichte. Während dieses zweiten Perfusionschrittes mit Collagenase war die Anwesenheit von Ca^{2+} Ionen notwendig, um die maximale Aktivität des Enzyms zu gewährleisten.

	EGTA-Puffer	Collagenase-Puffer
Glucose-Lösung (ml)	186	186
KH-Puffer (ml)	30	30
HEPES-Puffer (ml)	30	30
Aminosäure-Lösung (ml)	45	45
Glutamin-Lösung (ml)	3	3
EGTA-Lösung (ml)	1,2	-----
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -Lsg. (ml)	-----	4,8
Collagenase (mg)	-----	150

Um die Ausbeute, Viabilität und Reinheit der Zellen zu erhöhen, wurden die Parenchym- und Nicht-Parenchymzellen jeweils aus verschiedenen Ratten isoliert.

Vor dem Beginn der Perfusion wurden die Perfusionslösungen (EGTA- und Collagenase-Puffer) auf 37 °C im Wasserbad temperiert und gleichzeitig Silikon-schläuche mit der Kanüle in die Pumpe (Desaga, Heidelberg) eingelegt. Danach wurde EGTA-Puffer rezirkulierend und luftblasenfrei durch den Schlauch gepumpt.

Die Ratten wurden durch eine i.p. Injektion von Pentobarbital-Natrium (100 mg/kg) anästhesiert. Nachdem das Abdomen eröffnet worden war, wurde die Pfortader freipräpariert, nach einem kleinen Schnitt die Perfusionskanüle eingeführt und mit einem Faden fixiert. Gleichzeitig wurde die Vena cava superior durchgeschnitten, damit der Puffer unbehindert abfließen kann. Auf diese Weise wurde die Leber mit EGTA-Puffer unter einem Druck von ca. 18 cm Wassersäule und einem Fluß von 10 ml/min für 15 min perfundiert. Danach erfolgte die weitere Perfusion mit Collagenase-Puffer bei gleicher Flußrate bis die Leber eine erkennbar weiche Konsistenz angenommen hatte.

Nach der Perfusion wurde die Leber herauspräpariert und in eine Schale mit kaltem GBSS-Puffer gelegt. Die darauffolgenden Schritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt.

Aufarbeitung der Parenchymzellen

Mit Hilfe einer abgerundeten Pinzette und eines Spatels wurde die Leberkapsel entfernt und die Leber im GBSS-Puffer so geschwenkt, daß sich alle Leberzellen aus dem Gewebe lösten. Die Leberzellsuspension wurde dann durch ein Edelstahlfilter (Porenweite 125 μm) filtriert und die Rückstände der Leber wurden erneut mit Suspensionspuffer gespült. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugen-röhrchen aufgenommen und bei 4 °C und 50 g (Sigma 3K-2 Zentrifuge) für 3 min zentrifugiert.

Das Zellsediment, das hauptsächlich aus Parenchymzellen bestand, wurde vorsichtig in kaltem GBSS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang, bei dem der Überstand verworfen und die Zellsedimente in GBSS resuspendiert und zentrifugiert wurden, wurde dreimal durchgeführt, so daß letztendlich Hepatozyten von Nichtparenchymzellen getrennt worden waren. Zum Schluß wurden die Hepatozyten in 10-20 ml GBSS-Puffer aufgenommen und die Zahl und Vitalität sowie Reinheit der Zellen ermittelt (Kap. 3.4)

3.3 Isolierung der Nichtparenchymzellen

Nichtparenchymzellen wurden nach der von Brouwer et al. (1984) beschriebenen und später von Steinberg et al. (1987) modifizierten Methode isoliert.

Die Isolierung der Nichtparenchymzellen unterscheidet sich von der in der Kapitel 3.2 beschriebenen Methode zur Isolierung der Parenchymzellen in den folgenden Punkten. Zum einen enthielt der im zweiten Perfusionsschritt verwendete Collagenase-Puffer zusätzlich Pronase E in einer Konzentration von 0,05% (w/v); damit wurde eine selektive Zerstörung der Parenchymzellen erzielt. Zum anderen erfolgte nach Collagenase/Pronase E-Perfusion eine weitere Verdauung der zerkleinerten Lebermasse mit 0,05% Collagenase und 0,05% Pronase E in 100 ml GBSS für 30 min bei 4 °C unter starkem Rühren. Dies diente dazu, die noch vorhandenen Parenchymzellen enzymatisch und mechanisch zu zerstören. Danach wurde die Suspension durch eine Edelstahlfilter (Porenweite 125 μm) filtriert und anschließend bei 4 °C und 50 g für 3 min zentrifugiert. Im Gegensatz zur Isolierung Parenchymzellen wurde diesmal der Überstand, der die Nichtparenchymzellen enthält, weiterverwendet. Das Zellsediment wurde erneut in eiskaltem GBSS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Um die Nichtparenchymzellen, vor allem die Kupffer- und Endothelzellen zu sedimentieren, wurden die gesammelten Überstände bei 4 °C und 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in kaltem GBSS aufgenommen und resuspendiert.

Zur Trennung der Nichtparenchymzellen von noch darin enthaltenen (noch nicht völlig zerstörte oder mit Nichtparenchymzellen sedimentierte) Hepatozyten wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz® (5-(N-2,3-dihydroxypropyl-acetamido)-2,4,6-tri-iod-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-isophthalamid) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine hochmolekulare wasserlösliche Substanz mit einer Dichte von 2,1 g/ml, die zur Fraktionierung und Trennung von lebenden Zellen verwendet wird. Daher wurde zunächst die oben erhaltenen Zellsuspension im Verhältnis 11 : 14 mit Nycodenz-Stammlösung (28,7% in GBSS-Puffer ohne NaCl) gemischt und anschließend in zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Darauf wurde 1-2 ml GBSS vorsichtig mit einer Pasteurpipette überschichtet und anschließend bei 400 g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei bildete sich an der Grenzschicht zwischen Nycodenz und GBSS eine dichte Zellschicht aus. Diese braune Bande besteht aus Nichtparenchymzellen, vor allem Kupfer- und Endothelzellen. Nachdem die Zellen vorsichtig mit der Spitze einer Pasteurpipette abgehoben und in ein sauberes Zentrifugenröhrchen überführt worden waren, erfolgte ein Waschvorgang in 5-10 ml GBSS-Puffer und Zentrifugation bei 400 g für 3 min. Anschließend wurde das Sediment der Nichtparenchymzellen in 2-5 ml GBSS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

3.4 Bestimmung der Zellzahl, Vitalität und Reinheit der isolierten Zellen

Die Zellzahl wurde durch direkte, lichtmikroskopische Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen mit Trypanblau bestimmt. Dabei nehmen die lebenden Zellen wegen ihrer intakten Zellmembran kein Trypanblau auf und erscheinen bei lichtmikroskopischer Betrachtung farblos, während bei toten Zellen die Diffusion des Farbstoffs ins Cytoplasma ungehindert abläuft und die Zellen dadurch blau gefärbt erscheinen.

Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit GBSS verdünnt und diese Mischung im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau-Lösung (0,4% (w/v) in PBS) gemischt. Ein Tropfen davon gibt man unter das Deckglas der Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; Fläche 1mm²) und zählt die Zellen in den vier großen Quadraten der Zählkammer.

Berechnung:

Anzahl der lebenden Hepatozyten pro ml = Mittelwert aus vier Quadraten x Verdünnungsfaktor x10000 x Verdünnungsfaktor durch Zugabe der Trypanblau-Lösung. Der Mittelwert der Zahl lebendender Zellen dividiert durch die Gesamtzellzahl multipliziert mit 100 ergab die Vitalität der isolierten Zellen im Prozent.

Nichtparenchymzellen (Kupffer- und Endothelzellen) ließen sich lichtmikroskopisch durch ihre charakteristische Größe identifizieren.

Die Reinheit der isolierten Parenchymzellen bzw. Nichtparenchymzellen wurde als Prozentsatz des jeweiligen Zelltyps an der Gesamtzellzahl angegeben.

3.5 Herstellung der subzellulären Leberfraktionen von Ratten, Mäusen und Waldmurmeltieren

3.5.1 Mikrosomen Präparation aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Ratte

Die frisch isolierte Zellsuspension (2-6 Millionen Zellen/ml) wurde im Volumenverhältnis 1 : 2 in eiskalter isotonischer KCl-Lösung suspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung mit dem Sonifier Branson-B15 (Output Control 4; Duty Cycle 30%; 30 sec) zerstört. Dabei wurde die komplette Zerstörung der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Präparation der postmitochondrialen Fraktion (S-9) erfolgte durch Zentrifugation des Zellhomogenats bei 9000 x g (Rotor: SS34; Zentrifuge : RC2-B, DuPont) für 10 min bei 4 °C. Während Kerne und Mitochondrien dabei das Sediment bildeten, wurden die Membran des endoplasmatischen Retikulums und die lösliche Cytoplasmafraktion im Überstand erhalten.

Durch erneute Zentrifugation des Überstands mittels einer Ultrazentrifuge (Beckman, Rotor 60 Ti bei 35 000 Upm (= 100 000 x g) für 60 Minuten erhielt man die Mikrosomen als Sediment als Überstand das Cytosol. Die mikrosomale Fraktion wurde erneut im gleichen Volumen isotonischer KCl (pH 7,4) resuspendiert und in der Ultrazentrifuge, unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die daraus gewonnenen Mikrosomen wurde im gleichen Puffer mit Hilfe eines Virutis Homogenisators resuspendiert, nach Aliquotierung in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

3.5.2 Subzelluläre Leberfraktionen von HBV-transgenen und Kontrollmäusen

Die hier verwendeten transgenen Mäusen, [aktuelle Bezeichnung (Alb-1 HBV) Bri 44] wurden als Linie 50-4 im Labor von Dr. F.V. Chisari (Department of Molecular and Experimental Medicine, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California) erzeugt. Das Genom diese Mäuse enthält das HBV Bg/II-A Fragment unter der Kontrolle des Albuminpromoters. Diese transgenen Mäuse wurden aus den befruchteten Eizellen der Mäusepärchen C57BL/6 und SJL generiert, wobei man die kodierende Region des großen HBV-Hüllproteins in Vorkerne männlichen C57BL/6 Mäusen eingeschleust hatte.

Bei transgenen Mäusen bewirkte das Genkonstrukt eine Überproduktion des großen HBV-Hüllproteins, chronische Schäden der Leberzellen und schließlich die Entstehung von Leberzellkarzinomen.

In La Jolla wurden die Lebern von jeweils 6 transgenen-Mäusen und 6 Kontrollmäusen nach der Entfernung der Gallenblasen freipräpariert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Anlieferung nach Mainz erfolgte in Trockeneis. Die Lebern wurden unmittelbar nach der Ankunft bei -70 °C gelagert.

Am Tag der Präparation wurden die gefrorenen Lebern unter Eiskühlung aufgetaut und zweimal mit eisgekühlte isotonischer KCl-Lösung (pH 7,4) gewaschen, anschließend nach Bestimmung des Lebergewichts mit dem gleichen Puffer im Verhältnis 1 : 3 versetzt und die Gewebeproben mit einer scharfen chirurgischen Schere zerkleinert. Die Homogenisierung der Lebern unter Eiskühlung erfolgte dann mit Hilfe eines Homogenisators (Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Braun, Melsungen in einem Glaskolben mit Teflon-Pistill bei 500-600 Upm. Das darauffolgende Verfahren der Differentialzentrifugation zur Präparation der cytosolischen und mikrosomale Fraktion wurde wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die cytosolische und mikrosomale Fraktion aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

3.5.3 Subzelluläre Leberfraktionen von Waldmurmeltieren

Im Rahmen einer Kooperation stellte das Labor von Prof. Bannasch, Abteilung Cytopathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, die Leberstücke der Waldmurmeltiere zur Verfügung.

Die amerikanischen Waldmurmeltiere (*Marmota monax*) stammten ursprünglich von einem kommerziellen Züchter (Marmotech Inc., Ithaca, NY). Die WHV-positive Tiere wurden erzeugt, indem man die neugeborene Tiere mit 10 µl von infektiösem Serum (MTI-I Stamm von WHV) vom 2. bis 7. Lebenstag subkutan inokuliert hatte. Die infizierten Tieren wiesen in ihrem Blut WHsAg und WHV-DNA auf. Die Untersuchung bei WHV-freien Kontrolltieren ergab einen negativen Befund für alle WHV-Marker (Bannasch et al., 1995). Die WHV-infizierten und WHV-freien Tiere wurden dann im Alter von zehn Monaten vom DKFZ in Heidelberg erworben und unter Standardlaborbedingungen gehalten.

Zur Präparation der subzellulären Leberfraktionen wurden zehn WHV-positive und 8 WHV-freie Leberstücke verwendet. Die Präparation der mikrosomalen und cytosolischen Fraktion erfolgte Analog wie bei den HBV-transgenen Mäusen (siehe Abschnitt 3.5.2).

3.6 Charakterisierung von subzellulären Leberfraktionen

3.6.1 Bestimmung des Proteingehalts der Leberzellfraktionen

Die Bestimmung des Proteingehalts der mikrosomalen und cytosolischen Fraktion wurde nach der von der Firma Bio-Rad (München) beschriebenen photometrischen Methode mittels Bradford Reagenz durchgeführt (Bradford, 1976). Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß Eiweiß mit Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung einen Farbkomplex bildet und sich dabei das Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm verschiebt.

Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe der BSA-Stammlösung (100 µg/ml H₂O) bis zu Endproteinkonzentrationen von 1-20 µg/ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Endvolumen der BSA-Lösung betrug jeweils 800 µl. Zehn Minuten nach Zugabe von 200 µl Bradford Reagenz wurde die Extinktion bei RT bei 595 nm am Spektrophotometer gegen einen Blindwert gemessen. Der Proteingehalt unbekannter Proben konnten aus den gemessenen Extinktionen mittels der erstellten Eichgeraden berechnet werden.

3.6.2 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts

Der Gesamtgehalt an Cytochrom P450 (P-450) in mikrosomalen Leberfraktionen wurde mittels eines Doppelstrahl-Spektralphotometers über ein Differenzspektrum zwischen reduziertem CO-komplexiertem Cytochrom P450 und reduziertem P-450 ermittelt (Omura & Sato, 1964; Estabrook & Werringloer, 1978).

Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft des P-450-Hämproteins, im reduzierten Zustand (zweiwertiges Eisenzentralatom) einen Komplex mit Kohlenmonoxid zu bilden, dessen charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm liegt. Dabei wird der P-450-Gehalt durch Auswertung des Differenzspektrums zwischen dem Absorptionsspektrum des reduzierten Cytochrom CO-Komplex und des reduzierten P-450 ermittelt.

Zunächst wurde die mikrosomale Fraktion mit isotonischer KCl-Lösung (pH 7,4) auf 1 mg/ml Protein verdünnt und dann durch Zugabe von einigen Körnchen Natriumdithionit die Reduktion von P-450 und Cytochrom-b₅ erzielt. Nachdem die reduzierten Proben homogen gemischt worden waren, erfolgte die Verteilung der Proben zu je 1 ml in Proben- und Vergleichsküvette (Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke) und die Aufzeichnung der Null-Linie zwischen 400 und 490 nm mittels ein Zweistrahlsspektrophotometer. Nachdem die Probenküvette für 1 min mit Kohlenmonoxid

(CO-Gas; Linde, Mainz-Kostheim) begast ca. 1 Blase/Sekunde) worden war, wurde das CO-Differenzspektrum zwischen den oben genannten Wellenlängen erstellt. Dabei wird das Extinktionsmaximum bei etwa 450 oder 448 nm (je nach Induktor) gefunden. Die Konzentration an Cytochrom P450 in nmol/ ml Meßlösung wurde aus der Extinktionszunahme bei 450 nm (E) und dem bekannten molaren Extinktionskoeffizient des CO-Komplexes (= 91 cm²/mmol) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{P-450 [nmol]} = \frac{\Delta E \times 1000}{1 \times 91}$$

$$\Delta E = (E_{450} - E_{490})$$

Multipliziert man den so erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor und bezieht schließlich auf ein Milligramm Protein, erhält man den Gesamtgehalt an Cytochrom P450 in der ursprünglichen mikrosomalen Leberfraktion.

3.6.3 Methoden zur Aktivitätsbestimmung verschiedener Cytochrom P450-Isoenzymen

Die Aktivität von Isoformen Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen wurden durch Untersuchung von diagnostischen Substanzen in fluoreszierenden Produkten bestimmt.

3.6.3.1 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O- deethylase Aktivität in Mikrosomen

7-Ethoxyresorufin wird durch 3-Methylcholanthren induzierbare Cytochrom P-450-Isoenzyme (CYP1A1, CYP1A2) oxidativ zum Resorufin dealkyliert.

Die Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-deethylase Aktivität wurde in Anlehnung an die von Burke (1985) empfohlene Methode durchgeführt. Dazu pipettiert man 900 µl Probenpuffer (isoton. KCl-Lösung (pH 7,4), 10 mM MgCl₂), 10-20 µl (ca. 150 µg) mikrosomales Protein und 15 µl 7-Ethoxyresorufin (0,2 mM Ethoxyresorufin in Ethanol). Der Küvetteninhalt wird gut durchgemischt und im Wasserbad bei 25 °C für 1 min vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl NADPH (50mM; frisch angesetzt) gestartet und die Fluoreszenz gemessen. Durch Zugabe von 10 µl (100 pmol) Resorufin wurde die Eichung vorgenommen. Die Messung erfolgte an einem Spektrofluorimeter (Perkin-Elmer 650-40) bei einer Anregungswellenlänge von 522 nm und Emissionswellenlänge von 586 nm. Die Zunahme des Produktes pro Zeiteinheit kann direkt über die Zunahme der Fluoreszenz bestimmt werden. Daraus läßt sich dann die Aktivität in pmol umgesetztes Substratprodukt pro Minute und pro Milligramm Protein errechnen.

3.6.3.2 Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen 7-Cumarinhydroxylase und 7-Ethoxycumarin-O-deethylase

Das Substrat Cumarin wird zur Aktivitätsbestimmung der Cytochrom P450 2A-Subklasse, vor allem von Cytochrom P-450 2A5 der Maus eingesetzt. Es wird dabei zu 7-Hydroxycumarin umgesetzt. 7-Ethoxycumarin wird hauptsächlich durch 3-Methylcholanthren- und Phenobarbital-induzierbare CYP-450 Isoenzyme (1A, und 2B) zu 7-Hydroxycumarin umgesetzt

Die Bestimmung erfolgte auf der Basis der Methode von Ulrich und Weber (1972), die später von Greenlee und Poland (1978) modifiziert wurde. Die modifizierte Methode unterscheidet sich von der ursprünglichen Methode hauptsächlich dadurch, daß sie eine Endproduktmessung ermöglicht.

Der Inkubationsansatz (1000 μ l) bestand aus folgenden Lösungen:

0,25-1,0 mg mikrosomales Protein oder S-9 Fraktion, 5 mM $MgCl_2$ in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4). Mit Wasser wurde das Volumen auf 750 μ l aufgefüllt. Unmittelbar nach Zugabe des 0,5U/ml-NADPH-regenerierenden Systems erfolgte eine 5-minütige Präinkubationszeit bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 7-Ethoxycumarin 80 μ M oder 100 μ M Cumarin gestartet und für 10 Minuten bei 37 °C und 120 Upm im Schüttelwasserbad (Modell 18, mit Thermomix 1460, Braun, Melsungen) unter Luftzufuhr inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 μ l Trichloressigsäure (15% w/v in H_2O) gestoppt. Nach dieser Proteinfällung und anschließender Zugabe von 3 ml Dichlormethan erfolgte eine 15-minütige Extraktion mit Hilfe eines Überkopfschüttlers. Danach wurde zur besseren Phasentrennung die Suspension bei 300 x g für 5 Minuten (Tischzentrifuge, Sigma 4K10-Braun, Melsungen) zentrifugiert. Ein Aliquot (0,5 ml) der organischen Phase (untere Phase!) wurde in ein zweites Glasgefäß, in dem schon 2 ml Natriumborat-Puffer (60 mM pH, 9,0) vorgelegt worden waren, überführt. Nachdem das Gemisch geschüttelt und zentrifugiert worden war, wurde der wäßrige Überstand, der das gebildete 7-Hydroxycumarin enthielt, fluorimetrisch bestimmt (Anregungswellenlänge 358 nm, Emissionswellenlänge 458 nm). Enzymaktivität wurde mit Hilfe einer 7-Hydroxycumarin-Eichgerade bestimmt, wobei die einzelnen Proben unter gleichen Bedingungen wie der Inkubationsansatz aufgearbeitet wurden.

3.6.3.3 Inkubation mikrosomaler Fraktionen mit Testosteron

Inkubation und Aufarbeitung

Zur weiteren Charakterisierung des Isoenzymmusters der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen in Lebermikrosomen wurde die Hydroxylierung von Testosteron untersucht. Da die verschiedenen P-450-Formen in der Lage sind, Testosteron regio-

und stereoselektiv zu hydroxylieren, kann aus dem entsprechenden Metabolitenmuster auf die Aktivitäten verschiedener Formen von CYP geschlossen werden.

Die Bestimmung des Hydroxylierungsmusters von Testosteron wurde in Anlehnung an die Methode von van der Hoeven (1984) mit Modifizierungen nach Oesch et al., (1992) durchgeführt.

Dazu wurden in offenen Schliffreagenzröhrchen 40 μl MgCl_2 (100 mM), 200 μl NADPH-regenerierendes System (15,1 mg NADP und 77,9 mg Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz, in 4 ml isoton. KCl, pH 7,4 gelöst und kurz vor der Inkubation Zugabe von 1,2 Einheiten (20 μl) von D-Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) und eine Mikrosomensuspension, die 500 μg Protein enthielt, mit HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) auf ein Volumen von 590 μl aufgefüllt. Nach einer Vorinkubationszeit von 2 Minuten bei 37 °C und 120 Upm im Schüttelwasserbad (Modell 18, mit Thermomix 1460, Braun, Melsungen) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl Testosteron in Methanol (77,8 mM) gestartet und für 10 Minuten weiterinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl NaOH (60 mM) gestoppt, der Ansatz auf Eis gestellt, anschließend mit 40 μl ethanolischer Corticosteronlösung (120 μM) als innerer Standard versetzt und kräftig geschüttelt.

Die danach folgenden Extraktionsschritten wurden unter dem Abzug durchgeführt. Dazu wurde das Inkubationsgemisch (840 μl) auf eine Extraktionssäule (Varian Extube™ Extraction Columns, , Harbour City, CA, U.S.A.) gegeben und das Eluat in einem konischen Reagenzglas gesammelt. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten wurde auf die Extraktionssäule 4 ml Dichlormethan zugegeben. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Extraktionssäule ausgeblasen, die gesammelte Extrakte in einem Abdampfgerät (Linde, Höllriegelskreuth) schonend (35 °C) unter Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Chromatographische Trennung und Quantifizierung der Testosteron Metabolite

Die gewonnenen Extrakte wurden in 40 μl Methanol aufgenommen und über RP-HPLC mittels Anlage 1 (siehe Abschnitt 2.3) chromatographisch getrennt. Dazu wurde 10 μl der Probenlösung über eine 25 μl Probenschleife auf die chromatographische Säule gespritzt und unter folgenden Bedingungen getrennt:

Stationäre Phase:	Kromasil 100-C-18, Partikelgröße 5 μm , 4 mm ID Vertex-System mit Kromasilvorsäule; Säulenlänge: 250 x 4 mm (Knauer, Berlin)		
Mobile Phase:	A:	Wasser : Tetrahydrofuran (THF)	93 : 7 (v/v)
	B:	Methanol : Tetrahydrofuran	93 : 7 (v/v)

Gradient (linear):	30% mobile Phase B in 40 Minuten auf 65% und gleichzeitig 70% mobile Phase A im gleichen Zeitintervall auf 35%
Detector:	Dual-Channel UV (Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 254 nm
Fluß:	0,8 ml/min
Druck:	~160 bar

Vor der Quantifizierung wurde zunächst ein Standard-chromatogramm der authentischen Hydroxytestosterone erstellt. Mit Hilfe der Retentionszeit wurden die gebildeten Metabolite in den Proben identifiziert und wenn nötig mit den Metabolitenstandards co-chromatographiert. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte dann durch Integration der Peakfläche nach der Methode der Internen Standardisierung (Molitor, 1990).

3.6.4 Aktivitätsbestimmung der mikrosomalen Epoxidhydrolase

Die Aktivitätsbestimmung der Epoxidhydrolase nach Oesch et al. (1971) beruht auf einem radiometrischen Verfahren, wobei das Substrat [7(n)-³H] Styroloxid (STO) enzymatisch zu Styrolglykol umgewandelt wird.

Der Inkubationsansatz (Endvolumen 200 µl) enthält 52 µl Tris-HCl Puffer pH 9,0 (0,5M), 10 µl [7(n)-³H]-Styroloxidlösung (44 mM, 5,8 MBq/mmol) und 50-138 µl mikrosomale Fraktion (ca. 0,5 mg). Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Thermomix 1460, Braun, Melsungen) wird die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Petrolether gestoppt. Anschließend wird das Gemisch geschüttelt und bei 2500 U/min für 3 min zentrifugiert. die Petroetherphase mit dem unumgesetzten Styroloxid wird verworfen. Dieser Extraktionsvorgang wird mit Petrolether nochmals wiederholt und anschließend das Styrolglykol mit 1 ml Ethylacetat aus der wässrigen Phase extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Ein Aliquot (0,5 ml) der organischen Phase wird mit 6 ml Rotizsint 1100 vermischt und im Szintillationszähler gemessen.

Zur Ermittlung der Aktivität werden zunächst die Blindwerte (Inkubation ohne Mikrosomen) von der Radioaktivität der Proben abgezogen und die daraus resultierende Radioaktivität mit dem Korrekturfaktor 1,2 multipliziert, da bei Extraktion mit Ethylacetat nur ca. 82% des Styrolglykols wiedergefunden wird.

Der enzymatische Umsatz wird wie folgt berechnet:

$$\text{Substratumsatz [nmol]} = \frac{\text{Radioaktivität der organischen Phase [cpm]} \times 1,2}{\text{spezifische Aktivität [cpm/nmol]}}$$

3.6.5 Aktivitätsbestimmung cytosolischer Glutathion-S-transferasen

Das hier verwendete Verfahren zur Bestimmung der cytosolischen GST-Aktivitäten wurde nach einer von Habig et al. (1974) beschriebenen Methode unter Verwendung des Substrats CDNB durchgeführt. Hierbei handelt sich um eine nukleophile Substitution des Chloratoms durch Glutathion katalysiert durch verschiedene GST-Isoenzyme der cytosolischen Fraktion. Dabei kommt es zu einer Extinktionszunahme bei 340 nm, die spektrophotometrisch registriert werden kann.

Die Inkubationsansätze (Volumen: 1000 μ l) wurden in einer Plastik-Einwegküvette wie folgt zusammenpipettiert: 500 μ l Kaliumphosphat-Puffer (0,2 M, pH 6,5), 20 μ l Glutathion-Lösung (50 mM), 20 μ l CDNB-Lösung (50 mM) und 440 μ l H₂O. Diese Ansätze wurden im Wasserbad bei 26 °C vortemperiert und nach Zugabe von 20 μ l cytosolische Fraktion (ca. 300 μ g) im ebenfalls auf 26 °C temperierten Shimadzu MPS-200- Spektrophotometer bei 340 nm vermessen. Hierbei wurde die Absorptionsänderung während der enzymatischen Umsetzung als Funktion der Reaktionsdauer mit einem angeschlossenen Analogschreiber aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten im linearen Bereich. Mit Hilfe einer Kontrollinkubation, die alle Lösungen außer der cytosolischen Fraktion enthielt, wurde die nicht-enzymatische Absorptionsänderung bestimmt. Nach der Subtraktion dieses Wertes von der Absorptionsänderung der Proben wurde die Enzymaktivität anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet:

$$\text{Substratumsatz } [\mu\text{mol CDNB pro min}] = \Delta E / (\epsilon \times d)$$

$$\Delta E = \text{Extinktionsänderung}_{340}/\text{min}$$

$$\epsilon = \text{molre Extinktionskoeffizient von CDNB (9,6 cm}^2/\mu\text{mol)}$$

$$d = \text{Schichtdicke (1 cm)}$$

3.7 Methoden der Biotransformationsstudien von AFB₁

3.7.1 Inkubation von AFB₁ mit Mikrosomen der Parenchym- und Nichtparenchymzellen

Die quantitative Bestimmung von AFB₁-Metaboliten in Mikrosomen aus Parenchym- und Nichtparenchymzellen wurde in Anlehnung an die Methode von Monroe und Eaton (1987) mit einer geringfügigen Modifikation durchgeführt.

Diese Methode bietet den Vorteil, daß sowohl die quantitative als auch die qualitative Analyse der hydroxylierten Metabolite und des labilen AFB₁-8,9-Epoxids (in Form seines GSH-Konjugats) gleichzeitig durchgeführt werden können.

Dabei enthält der Inkubationsansatz nicht nur die üblichen NADPH-regenerierenden Cofaktoren und Mikrosomen sondern auch überschüssiges GSH und die cytosolische Fraktion der Mausleber. Das gebildete AFB₁-Epoxid wird dann durch die cytosolischen Glutathion-S-transferasen (GST) katalytisch mit GSH konjugiert. Um die maximale GST-Aktivität in der cytosolischen Fraktion zu erzielen wurde Lebercytosol von weiblichen CD-1 Mäusen verwendet, die mit Butyl-Hydroxyanisol (BHA) behandelt worden waren.

Der Inkubationsansatz (Gesamtvolumen 500 µl) setzte sich wie folgt zusammen: 80 mM Tris-HCl (pH 7,4), 72 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 5 mM Glucose-6-phosphat, 5 mM GSH, 2 mg/ml mikrosomales Protein und 3 mg/ml cytosolisches Protein aus BHA-behandelten Mäusen.

Nach einer Vorinkubationszeit von 10 Minuten bei 37 °C in Schüttlerbad (120 Upm) in offenen Gefäßen wurde die Reaktion durch Zugabe von 16 oder 128 µM AFB₁ (20 µl in DMSO) gestartet. Die Inkubation wurde durch Zugabe einer gleichen Menge (500 µl) eiskaltem Methanol, das 61 µM AFG₁ als interner Standard enthielt, beendet. Um eine vollständige Proteinfällung zu erzielen, wurde der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert.

3.7.2 Aufarbeitung der Inkubationsansätze und chromatographische Trennung von AFB₁- Metaboliten

Der mit eiskaltem Methanol versetzte und über Nacht bei -20°C gelagerte Inkubationsansatz wurde zur besseren Phasentrennung bei 14900 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Um eine vollständige Trennung des GSH-Konjugats vom Protein zu erreichen, wurde das Sediment mit 500 µl eines Gemischs aus Methanol und Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 3,0) (1 : 1 v/v) versetzt. Das Gemisch wurde durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und dann abzentrifugiert. Danach wurde das

Sediment erneut in einem Gemisch (500 μ l) von Methanol und Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,0) (1:1 v/v) aufgenommen, durch Ultraschallbehandlung gelöst und anschließend zentrifugiert. Nach der Vereinigung der gesammelten Überstände wurde der Methanolanteil bei leichter Erwärmung unter einem N₂-Strom verdampft, der Restextrakt in einem Vakuumtrockner "Speed Vac" bei RT zur Trockene gebracht und bis zur HPLC Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Vor der Analyse mittels RP-HPLC wurde der Extrakt in 500 μ l Methanol/H₂O (1 : 1 v/v) aufgenommen und 100 μ l davon über eine reversed Phase Säule (Spherisorb S5 ODS 2(C18), 250 x 4 mm, Korngröße 5 μ m (Knauer Säulentechnik, Berlin) chromatographiert. Die chromatographische Trennung erfolgte mit HPLC-Anlage 2 (siehe Abschnitt 2.3).

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Laufmittel A, bestehend aus 20 mM Ammoniumacetat (pH 4,0) und Laufmittel B, bestehend aus Acetonitril/Methanol 1:1), verwendet. Das Mischungsverhältnis von Laufmittel A und B änderte sich beginnend mit 90% A und 10% B nach 2 Minuten linear auf 76% A und 24% B, nach 10 Minuten auf 38% A und 62% B und innerhalb von 25 Minuten stieg der Gradient von Laufmittel A linear auf 55% und von B auf 45%. Danach wurde für 15 Minuten mit 100% Methanol gespült. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 0,8 ml/min und einem Druck von 180-220 bar. Die Detektionswellenlänge war 365 nm. Während des gesamten HPLC-Laufes wurden die Laufmittel unter einer Helium atmosphäre gehalten, um die Entwicklung von Luftblasen im System zu vermeiden.

Die Identifizierung von metabolisch gebildeten AFM₁, AFQ₁ und AFP₁ erfolgte anhand des vergleichs mit käuflich erworbenen Referenzsubstanzen. Die Identifizierung des AFB₁-GSH-Konjates erfolgte zum einen mittels Co-Chromatographie und zum anderen wurden die UV/VIS-Spektren der metabolisch gebildeten und synthetisch hergestellten AFB₁-GSH-Konjugate mittels eines Diodenarraydetektors verglichen. Dafür stand eine weitere HPLC-Anlage im Labor von Prof. Unger, Universität Mainz, zur Verfügung. Diese Anlage (Chemstation Serie 1050, Hewlett Packard, Bad Homburg) bestand Injektionsventil mit einer Probenschleife von 20 μ l, einer HPLC-Pumpe, einem Diodenarray-Detektor (Wellenlängenbereich 190 bis 600 nm) sowie der Steuer- und Auswertsoftware. Die Authentizität des synthetisch hergestellten AFB₁-GSH-Konjugates wurde letztendlich durch NMR-Spektroskopie überprüft. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand der Peakflächen in Relation zum internen Standard.

3.7.3 Inkubation von AFB₁ mit Lebermikrosomen aus der HBV-transgenen Mäusen sowie mit Mikrosomen der Walddarmeltieren

Die Bestimmung des metabolischen Umsatzes von AFB₁ durch Lebermikrosomen von Mäusen und Walddarmeltieren sowie von den entsprechenden Kontrolltieren wurde, wie unter Kap. 3.7.1 beschrieben, durchgeführt. Hier wurde allerdings statt unmarkierten AFB₁, tritiierte [G-³H] AFB₁ eingesetzt. Dazu wurde zunächst das tritiierte Substrat mit unmarkiertem AFB₁ auf die gewünschte spezifische Aktivität von 0,35 -1,24 GBq/mmol verdünnt.

Zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität wurden vor und nach den Inkubationsansätzen jeweils 10 µl der [G-³H]-AFB₁ Lösung in DMSO auf je 3 Szintillationsvials (Roth, Karlsruhe) verteilt, mit je 4 ml Szintillationscocktail (Aquasafe 300, Zinsser Analytic, Frankfurt) gemischt und im Szintillationscounter (Tricarb 4640, Packard, Frankfurt) ausgezählt. Der daraus erhaltene Mittelwert diente zur Bestimmung der im Versuch eingesetzten Radioaktivität.

Der Inkubationsansatz wurde analog zur unter Kap. 3.7.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Das Inkubationsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 490 µl wurde in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C für 5 min vorinkubiert. Die metabolische Umsetzung des Substrates wurde durch Zugabe von 128 µM [G-³H]AFB₁ (spezifische Aktivität 0,35 GBq/mmol) oder 16 µM [G-³H]AFB₁ (spezifische Aktivität 1,24 GBq/mmol), gelöst in 10 µl DMSO, gestartet.

Die Inkubation wurde nach 15 min durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Methanol beendet und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Proben wie unter 3.7.2 beschrieben extrahiert, eingengt, zur Trockene gebracht und in 250 µl Methanol/H₂O (1:1, v/v) aufgenommen. Ein Aliquot wurde mit Aquasafe 300 vermischt, die Radioaktivität in der wässrigen Phase bestimmt und der Rest bis zur Analyse über RP-HPLC bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.4 Chromatographische Trennung und Quantifizierung der [G-³H]AFB₁-Metabolite

Die Trennung der Extrakte erfolgte an der HPLC-Anlage 1 (Kap. 2.3).

Dazu wurde ein Aliquot von 100 µl über eine RP-Säule (Kap. 2.3) unter Verwendung von folgenden Laufmitteln und dem gleichen Gradient wie in Abschnitt 3.7.3 getrennt:

Laufmittel A: Ammoniumacetat-Puffer (20 mM, pH 3,5)

Laufmittel B: Methanol : Tetrahydrofuran (93 : 7, v/v)

Die Identifizierung der einzelnen Metaboliten erfolgte wie unter Kapitel 3.7.3 beschrieben. Dazu wurden die Radiochromatogramme erstellt und mit den UV-Chromatogrammen verglichen

Da es sich hier um eine radiometrische Quantifizierung der Metaboliten handelte, wurden die radioaktiven Eluate in Abständen von 18-sec mit Hilfe eines Fraktionssammlers (RediRak, LKB, München) in Mini-Vials gesammelt. Dazu wurden jeweils 4 ml Szintillationscocktail (Aquasafe 300, Zinsser Analytic, Frankfurt) zugemischt und danach die Aktivität im Szintillationszähler (Tricab 4640, Packard, Frankfurt) gemessen. Die Berechnung der Aktivität in dpm erfolgte mit einer Tritium-Standard-Quenchkurve.

Um die Konzentrationen der einzelnen Metaboliten zu bestimmen, wurde zunächst die Summe aller Fraktionen in dpm und dann der prozentuale Anteil von einzelnen Metaboliten (ROI, region of interest) an der Gesamtradioaktivität ermittelt. Danach wurde die Menge der jeweils gebildeten Metaboliten nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Metabolit [nmol]} = \frac{\text{ROI [\%]} \times \text{Gesamtradioaktivität des Extrakts [dpm]}}{\text{spezifische Aktivität [dpm/nmol]} \times 100}$$

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Isolierung von Hepatozyten der Maus

Die Isolierung der Maushepatozyten durch eine Zweistufenperfusion der Leber in situ mit EGTA/Collagenase wurde in Anlehnung an die Technik der Isolierung von Rattenhepatozyten durchgeführt. (Kap. 3.2). Allerdings war es hier notwendig sowohl die Perfusion als auch die Aufarbeitungsprozedur zu modifizieren.

Zusammensetzung*	EGTA-Puffer (150 ml)	Collagenase-Puffer (150 ml)
HBSS-Stammlösung (10 x)	15	15
HEPES-Puffer (ml)	30	30
NaHCO ₃ -Lösung(ml)	5	5
EGTA (ml)	0,75	-----
BSA (g)	1,1	-----
CaCl ₂ x 2H ₂ O (ml)	----	3,5
Collagenase (mg)	----	18
H ₂ O (ml)	99	96,5

* Zur verwendeten Lösungen und Substanzen Kap. 2.2

Die Mäuse wurden mit einer 3%-igen Pentobarbital-Natrium-Lösung (0,1ml/25 g Körpergewicht) anästhesiert. Die Perfusionslösungen (EGTA/Collagenase) wurden zunächst für 10 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nachdem der Bauchraum mit sterilem Präparationsbesteck eröffnet und die Pfortader freipräpariert worden war, erfolgte die Perfusion der Leber mit dem EGTA-Puffer (Flußrate 8 ml/min) für 10 min. Die hier verwendeten Perfusionschläuche hatten einen Innendurchmesser von 3 mm und endeten mit einer Flügelkanüle (0,8/20 mm). Anschließend erfolgte die Perfusion mit Collagenase-Puffer bis sich eine weiche und größere Lebermasse feststellen ließ. Nach beendeter Perfusion wurde die Gallenblase entfernt, die Leber vorsichtig herauspräpariert und in eine mit 10 ml eiskaltem HBSS-Puffer (enthält 5% BSA, pH 7,4) gefüllte Petrischale überführt. Die anschließende Leber- und Zellaufarbeitung erfolgte unter Sterilbedingungen wie unter Kap. 3.2 beschrieben. Modifiziertes Leibovitz L-15 Medium (Gibco BRL, Paisly, Scotland) wurde anstatt GBSS als Waschpuffer verwendet.

3.8.2 Kultivierung der Maushepatozyten und Behandlung mit PB und TGF-β₁

Zur Kultivierung von isolierten Hepatozyten wurde Williams E Medium (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 10% foetalem Kälberserum (FCS, Greiner, Nürtingen) benutzt. Das Medium enthält zusätzlich folgende Substanzen in den Endkonzentrationen: 4 mM Glutamin, 10 mM HEPES (pH 7,4), 5 mg/ml Streptomycin, 5 mg/ml Penicillin, 1 µg/ml Hydrocortison, ITS (Insulin 5 µg/ml, Transferrin 5 µg/ml, Natriumselenit 5 ng/ml) und 1,25 mg/ml BSA.

Die Hepatozytenkulturen wurden auf einer unbeschichteten Gewebekulturschalen (90 mm Durchmesser, Greiner) bei einer Zelldichte von 5 x10⁶/ Petrischale angelegt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit bei 37 °C. Nach einer Anheftungzeit von 3-4 Stunden wurden die toten Zellen durch Absaugen des serumhaltigen Mediums entfernt und die am Boden angehefteten Zellen vorsichtig mit warmen PBS zweimal gewaschen. Rekombinante TGF-β₁ wurde in drei verschiedene Konzentrationen (0,1 0,25 und 0,5 ng/ml serumfreies Medium), Phenobarbital in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Die Kontrollen wurden mit substanzfreiem Medium behandelt. Die Kultivierungsdauer der Zellen betrug bis zu 72 Stunden. Dabei wurde eine erneute Behandlung mit TGF-β₁ und PB sowie der Mediumwechsel in 24-Stunden-Intervallendurchgeführt. Alle Arbeitsvorgänge der Kultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zur Bestimmung der 7-Cumarinhydroxylase-Aktivität und für das Western-blotting wurde das Medium jeweils nach 24- 48- und 72-Stunden vollständig entfernt, die Zellen durch Abschaben vom Kulturgefäß abgelöst und anschließend in 10 ml eiskaltem 150 mM isoton. KCl-Puffer (enthält 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) aufgenommen. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension bei 50 x g für 5 min (4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment erneut gewaschen. Anschließend wurde die Zellen in 1 ml isoton. KCl-Puffer aufgenommen und durch Ultraschall mit dem Sonifier zerstört (Kap. 3.2). Das Homogenat wurde in Reaktionsgefäßen überführt und in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Osterode) bei 10000 Upm x 10 min (+ 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand (S-9 Fraktion) des Zellhomogenates wurde zur Bestimmung der 7-Cumarinhydroxylase Aktivität und für das Western-Blotting aliquotiert, in flüssigem N2 eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt (siehe 3.5.1).

3.8.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Nachweis von Cytochrom P450-Isoenzymen

3.8.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein Trennverfahren, in dem mit Hilfe einer konstant Stromstärke sowie durch die Molekularsiebwirkung des vernetzten Polyacrylamids eine Auftrennung der in der jeweiligen Probe enthaltene Proteine nach deren relativen Molekulargewicht erfolgt. In der Regel werden die Proteine in Anwesenheit eines Überschusses des ionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) durch Erhitzen denaturiert und gleichmäßig mit negativ geladenen Gruppen versehen. Durch Reagenzien wie β -Mercaptoethanol werden die Disulfid-Brücken gespalten und die Proteine in ihren Untereinheiten zerlegt. Die denaturierten Proteine wandern entsprechend ihrer Molmasse in Richtung Anode.

Verwendete Lösungen:

Acrylamid-Lösung:	30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen lösen und filtrieren
Trenngelpuffer:	1,88 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,625 M Tris-HCl, pH 6,5
SDS-Lösung:	0,5% (w/v) in H ₂ O
APS-Lösung:	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O (immer frisch angesetzt)
TEMED:	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Laufpuffer (1x):	Trisbase (25 mM)+ Glycin (190 mM)+SDS (0,1%) pH~8,3
Probenpuffer:	2,0 ml Sammelgelpuffer + 0,2 g SDS + 5 ml Glycerin + 0,5 ml (β -Mercaptoethanol + 0,1 ml Bromphenolblau (1% in Ethanol) + 2,4 ml H ₂ O

Herstellung des Trenngels und Sammelgels:

Stammlösungen	Acrylamdkonzentration				
	Trenngel				Sammelgel
	7,5%	10%	12,5%	15%	5%
30% Acrylamid (ml)	1,5	2,0	2,5	3,0	1,0
Trenngelpuffer (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	
Sammelgelpuffer (ml)	---	---	---	---	1,2
0,5% SDS (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Aq. bidest (ml)	2,1	1,6	1,1	0,6	2,6
TEMED (μ l)	5	5	5	5	6
10% APS (μ l)	30	30	30	30	30

Zunächst wurde die Gießkassette zusammengebaut. Die Kassette bestand aus zwei Glasplatten, dazwischen eine 5 mm breite Silikongummidichtung als Abstandshalter und Klammern zum Verschließen. Die Höhe der Silikongummi-Dichtung, die auch die Dicke des Gels bestimmte betrug 0,5 mm.

Zur Herstellung des Trenngels von 14 x 16 cm und 0,5 mm Dicke (30 ml Gel) bzw. 8 x 10 cm und 0,5 mm Dicke (6 ml Gel) für die SDS-PAGE wurden die folgenden Lösungen gemäß Tabelle zusammenpipettiert :

Kurz vor dem Gießen wurden die 10% APS-Lösung und TEMED hinzugefügt und damit die Polymerisation gestartet. Danach wurde das Gel sofort in einer vorher zusammengebauten Gießkassette gegossen, bis der Flüssigkeitsspiegel ca. 3 cm unterhalb der Kante stand und sogleich mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert hatte, wurde das Wasser abgesaugt und für den zweiten Gießschritt mit Sammelgel bereitgestellt. Das Gel kann an dieser Stelle über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden. Dazu überschichtet man mit 5 ml 0,1% SDS und deckt mit befeuchtetem Küchenpapier sowie einer Lage Frischhaltefolie ab.

Das Sammelgel (5%) wurde gemäß der Tabelle in einem 100 ml Becherglas zusammenpipettiert: Das Sammelgel wurde über das Trenngel geschichtet, Plastikkämme als Probestaschenformer zwischen den Platten eingesetzt und die Gele bis zum Ende der Polymerisation stehengelassen.

Probenaufbereitung:

Nach Einstellung des gewünschten Proteingehalt wurde das Gesamtvolumen der Proteinlösungen mit Probenpuffer 1:1 verdünnt und anschließend sowohl die Proben als auch der Molekulargewichtsmarker 3 min im kochenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Aufgetragen wurde bis zu 10 µg Protein in jeder Spur in einem Volumen von 20 µl. Um die relative Molekülmasse der unbekannt Proteine in den Proben zu bestimmen, wurden als Molekular-gewichtsmarker die Kits SDS-7 (Sigma, Produkt Nr. ; MW 192 bis 36 kDa) oder Color Markers High Range (Sigma, Produkt Nr. 3312; MW : 205 bis 29 kDa) verwendet. Der Marker wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Proben aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Nach dem Einspannen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde die Kammer mit dem Laufpuffer gefüllt und die Taschenformer langsam herausgezogen. Die Probe und die Molekulargewichtsmarker wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Geltasche des Sammelgels aufgetragen. Zur Konzentrierung der Proteinbanden im Sammelgel wurde zunächst ein Vorlauf bei einer Stromstärke von 25 mA gestartet und danach erfolgte die elektrophoretische Trennung bei konstanter Stromstärke von 40 mA. Dabei diente Bromphenolblau, das im Probenpuffer enthalten war, zum Kontrollieren der Front der wandernden Proteine.

3.8.3.2 Western-Blotting und immunologischer Proteinnachweis

Dieses Verfahren dient zum Transfer der in der SDS-PAGE elektrophoretisch getrennten Proteine auf Nitrocellulose. Mit Hilfe Cytochrom P-450 spezifischer Antikörper können dann die verschiedenen Cytochrom P-450 Isoenzyme qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die hier verwendete Methode des Blotting beruht auf dem Verfahren, daß von Towbin et al (1979) beschrieben wurde.

Verwendete Lösungen und Puffer:

Transferpuffer:	25 mM Tris, 190 mM Glycin in 20%wässrigen Methanol
Blockierlösung:	3 g BSA, 500 µl Tween 20 ad 100 ml TBS
(Inkubationslösung:	0,5% Gelatine, 0,1% Tween 20 in TBS
Färbereagenzien:	
NBT:	Nitroblau-Tetrazolium-Salz, 75 mg/ml) in 70% wässrige DMF
x-Phosphat :	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 50 mg/ml in DMF
Färbepuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂

Es wurde zunächst in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne in der Reihenfolge: Schaumstoffmatte, 3 Lagen Whatman 3 MM Papier, Nitrocellulose, das Gel, 3 Lagen 3 MM Whatman Papier und Schaumstoffmatte luftblasefrei übereinander-gelegt und zusammen mit den Kunststoffhaltern in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer vertikal eingeschoben, dabei zeigte die Nitrocellulose zur Anoden-seite und das Gel zur Kathodenseite. Die Kammer wurde dann an eine Stromver-sorgung angeschlossen und mit 100 mA bei RT über Nacht geblottet.

Die mit Proteinen beladene Nitrocellulose wurde zunächst in Blockierlösung für 1 Stunde bei RT unter konstantem Schütteln inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Nitrocellulose wurde dann dreimal für je 10 min mit der Inkubationslösung gewaschen. Nachdem die Nitrocellulose-Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt worden war, erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper (AK). Um den entstandenen Antigen-AK Komplex mit einer Farb-reaktion nachzuweisen, wurde ein zweiter AK verwendet, der gegen den ersten AK gerichtet und der mit dem zur Färbung notwendigen Enzym AK (AP) konjugiert war.

Im Falle von Untersuchungen bei Parenchym-und Nichtparenchymzellen der Ratte wurde als 1. AK ein monoklonales CYP-450 2C11 Maus Antiserum (NatuTec, Frankfurt) (1:500 verdünnt im Inkubationspuffer) als 2. AK ein Anti-Maus Antikörper-AP (1:10000) verwendet. Im Fall von Lebermikrosomen aus HBV-transgenen Mäusen und für die TGF- β 1 Studie wurde ein polyklonales CYP 2A5 Chicken Antiserum (1:500) als erster Antikörper und AP-komplexierte anti-Chicken IgGs (Sigma) (1:10000) als zweiter Antikörper eingesetzt. Nachdem die Blots mit dem zweiten AK für 1 Stunde bei RT unter ständigen Schütteln inkubiert worden waren, wurden sie dreimal gewaschen. Schließlich erfolgte die Färbung der Blots mit den Färbereagenzien NBT und x-Phosphat. Zur Färbung wurden erst kurz vorher 4,5 μ l der NBT-Lösung und 3,5 μ l der X-Phosphat-Lösung mit 1 ml Färbepuffer gemischt und die Blots in der Färbelösung ohne zu schütteln inkubiert. Die Farbentwicklung wurde nach ca.15 min durch mehrmaliges Spülen der Blots mit bidest. Wasser abgestoppt und diese anschließend auf Papiertüchern luftgetrocknet.

3.8.4 Nachweis der Apoptose nach Behandlung der Maushepatozyten-kultur mit TGF- β 1

3.8.4.1 morphologische Untersuchungen

Der hier angewendete Nachweis der Apoptose beruht auf der selektiven Anfärbung der Zellkerne von kultivierten Hepatozyten mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Der

verwendete Farbstoff, Hoechst 33258 oder Bisbenzimid gehört zu den unspezifisch DNA-bindenden Substanzen. Bei einer Färbung enthalten die apoptotischen Zellen aufgrund ihrer Chromatinfragmentierung entweder als stark fluoreszierende "apoptotic bodies" oder mit kondensiertem Chromatin auffallen, während die normalen Hepatozyten intakte Zellkerne aufweisen.

Die Kultur sowie die Behandlung von Maushepatozyten mit TGF- β 1 wurde wie unter Kap. 3.8.2 beschrieben durchgeführt. Statt normaler Petrischalen wurden speziellen Kulturgefäße verwendet, die mit Objektträgern ausgestattet sind (TC Chamber Slides, NUNC, Wiesbaden). Zur Fixierung der kultivierten Hepatozyten wurde jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden Kulturdauer das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden der Zellrasen in einer Fixierlösung (Methanol/Eisessig, 4 : 1) für 20 Minuten fixiert. Nachdem das Präparat mit Aqua bidest gespült und luftgetrocknet worden war, erfolgte die Färbung der Zellen mit Bisbenzimid oder Hoechst 33258 (Endkonzentration 0,15 μ g/ml, frisch hergestellt in PBS) für 20 Minuten. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und die Zellen zweimal mit Aqua bidest gespült und luftgetrocknet.

Um eine optimale Fluoreszenz zu gewährleisten, wurde das Präparat mit einer Lösung von Zitronensäure (20 mM), Dinatriumorthophosphat (50 mM) in 50% wässrige Glycerol überschichtet und mit einem und Deckglas bedeckt. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Präparats mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes bei einer Wellenlänge von 350-460 nm.

3.8.4.2 Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Apoptose

Isolierung der DNA

Die Maushepatozyten wurden analog zu der Methode unter Kap. 3.8.2 kultiviert, behandelt, jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und eingefroren. Die tiefgefrorenen Zellsedimente wurden aufgetaut, in 0,2 ml PBS resuspendiert und mittels 1 ml Lyse-Puffer (0,1% Triton X-100, 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA) versetzt. Nach Zugabe von 10 μ l Proteinase K (20 mg/ml) wurden die Proben für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Extraktion der genomischen DNA mit Phenol:Chloroform (1:1) und anschließender Ethanol-Fällung. Das Präparat wurde bei -80 °C über Nacht gelagert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 g (4 °C) wurde das DNA-Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet ("Speed vac"). Die DNA wurde dann in 100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,9], 1 mM EDTA) gelöst und mit RNase A (Endkonzentration 10 μ g/ml) für 3 Stunden bei 37 °C

inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt, um die Menge und die Reinheit der DNA zu ermitteln.

Agarosegel-Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde zunächst ein 2,0%-iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen und mit 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht. Die Gellösung wurde mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und nach der Polymerisation mit 0,5 x TBE-Laufpuffer überschichtet. Ein Aliquot der DNA-Lösung wurde mit RNA-sterilem Wasser verdünnt, 10% Probenpuffer (10 x Puffer = 10 ml : 5,75 ml 87%v/v Glycerin, einige Körner Bromopūhenolblau) dazugegeben und auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die mit Ethidiumbromid interkalierte DNA wurde dann im UV-Licht (254 nm) betrachtet und das Resultat fotografisch dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung und Induktion von AFB1-metabolisierenden Enzymen in verschiedenen Leberzelltypen der Ratte

4.1.1 Ausbeute, Vitalität und Reinheit der isolierten Leberzelltypen

Um eine größtmögliche Ausbeute und Reinheit der Nichtparenchymzellen zu erzielen, wurden PC und NPC aus unterschiedlichen Ratten isoliert. Die Ausbeute an PC sowohl aus unvorbehandelten als auch aus vorbehandelten Tieren reichte von 180–436 x10⁶ Hepatozyten. Bei den NPC wurde eine Ausbeute zwischen 65 und 250 x 10⁶ Zellen erzielt. Die Vitalität der PC, beurteilt durch den Trypan-Blau-Ausflußtest, lag bei 80%, während bei NPC eine Vitalität von bis zu 97% erreicht wurde.

Die Reinheit der frisch isolierten PC lag im Durchschnitt bei 90%, während bei den NPC Präparationen der Anteil an PC unter 1% lag. Die in dieser Arbeit verwendeten NPC wurden streng nach jeder Isolierung auf Verunreinigungen mit PC lichtmikroskopisch kontrolliert. Dabei wurden nur Isolierungen weiter verwendet, bei denen der Anteil an PC unter 1% lag. Der Proteingehalt betrug in PC 2,2 mg pro 1 x 10⁶ Zellen, während bei der NPC 0,24 mg pro 1 x 10⁶ Zellen gemessen wurde. Vorbehandlung der Tiere mit Induktoren hatten keinen Einfluß auf Ausbeute, Vitalität und Reinheit der isolierten Zellen, jedoch nahm der Protein-Gehalt nach Aroclor 1254-Induktion bei den PC und NPC um 72% bzw. 50% zu. Nach Phenobarbital-Induktion stieg der Protein-Gehalt bei den PC und NPC um 41% bzw. 23% an.

4.1.2 Cytochrom P450-Gehalt

Der Cytochrom P450 Gesamtgehalt wurde in Mikrosomen der PC aus nicht vorbehandelten und vorbehandelten Ratten bestimmt. Wie Tab. 4.1 zeigt, führte die Behandlung der Ratten mit Induktoren der Cytochrom P450 Monooxygenasen zu einer leichten bis starken Zunahme des Cytochrom P450-Gesamtgehalts.

Vorbehandlung	Anzahl der Ratten	Cytochrom P450-Gehalt (nmol/mg mikrosomales Protein)
Kontrolle	3	0,86 ± 0,07
Phenobarbital	3	1,55 ± 0,16
3-Methylcholanthren	3	1,23 ± 0,11
Isosafrol	4	1,40 ± 0,15
Aroclor 1254	3	2,32 ± 0,33

Tab. 4.1: Cytochrom P450-Gehalt in PC-Mikrosomen aus nicht vorbehandelten und vorbehandelten Ratten (Angegeben sind Mittelwerte ± SD)

Der Gesamtgehalt an Cytochrom P450 in den Mikrosomen der NPC konnten wegen der sehr geringen Proteinmenge nicht bestimmt werden. Wie Untersuchungen früherer

Arbeiten gezeigt haben (Lafranconi et al., 1986), konnte in Mikrosomen aus NPC von unbehandelten Ratten der P-450-Gehalt in Höhe von 66 pmol/mg mikrosomales Protein nachgewiesen werden. Dabei stieg nach Induktion mit Aroclor 1254 der P-450-Gehalt auf das 6,3-fache (416 pmol/mg mikrosomales Protein) an. In den eigenen Untersuchungen führte die Induktion mit Aroclor 1254 in NPC zu einem spektralphotometrisch meßbaren Gesamtgehalt von 534 pmol P-450/mg mikrosomales Protein an. Wenn man einen Vergleich macht, dann würde der Gesamtgehalt von P-450 in NPC aus unvorbehandelten Ratten um etwa das 13-fache niedriger liegen als in PC-Mikrosomen. Die Induktion der NPC mit Aroclor 1254 führte zu einem starken Anstieg des gesamten P-450-Gehalts, der um den Faktor 8,0 erhöht war, während der Induktionseffekt von Aroclor 1254 in PC-Mikrosomen nur 2,7 betrug.

4.1.3 Testosteron-Metabolismus in Mikrosomen aus PC und NPC von unbehandelnden Ratte

Neben dem Gesamt P-450-Gehalt spielt das Isoenzymmuster der exprimierten P-450 Enzyme für die Fremdstoffmetabolisierung eine wichtige Rolle. Testosteron wurde als diagnostisches Substrat verwendet, um auf der Basis des Hydroxylierungsmusters (Abb. 4.1) Rückschlüsse auf die an der Metabolisierung beteiligten Isoenzymformen in Mikrosomen aus den isolierten PC und NPC zu erhalten.

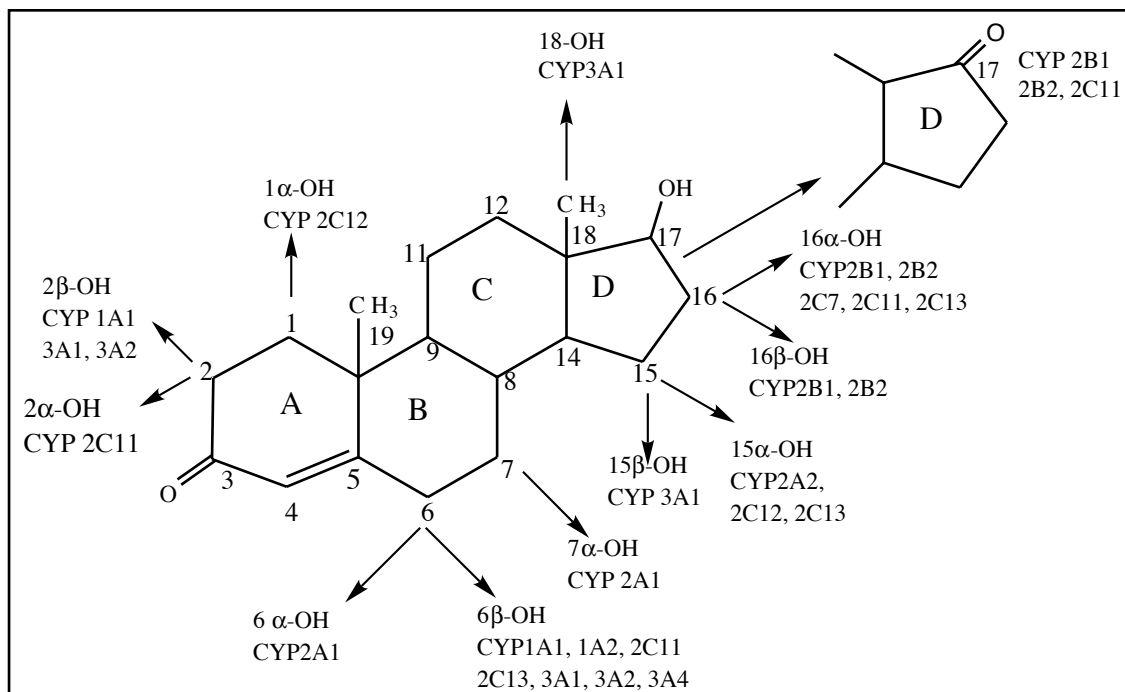


Abb. 4.1: Regio- und stereoselektive Biotransformation von Testosteron durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus der Rattenleber (nach Levin et al., 1984).

Die Umsetzung von Testosteron in PC-Mikrosomen aus unvorbehandelten Ratten führte zur Bildung von Androstendion, 2 α - und 16 α -OHT als Hauptmetabolite, gefolgt von 7 α - und 6 β -OHT sowie sehr geringen Mengen von 2 β -, 6 α -, 16 β - und 15 β -OHT. NPC-Mikrosomen lieferten ein ähnliches Hydroxylierungsmuster wie PC-Mikrosomen, allerdings betrug der Gesamtumsatz der NPC-Mikrosomen um 38% der Wertes der PC-Mikrosomen (Tab. 4.2). Die drei Metabolite 2 α -, 16 α -OHT und A-dion, die als Umsatzprodukte des spezifisch männlichen Isoenzym CYP2C11 der Ratte bekannt sind, trugen mit über 83% zum Gesamtumsatz der Kontrollmikrosomen aus den beiden Zelltypen bei.

Metabolite	Parenchymzellen		Nichtparenchymzellen	
	Umsatz (pmol/mg x min)	%	Umsatz (pmol/mg x min)	%
6 α -OHT	38 \pm 3	0,6	57 \pm 35	2,0
15 β -OHT	20 \pm 8	0,3	43 \pm 34	1,6
7 α -OHT	464 \pm 88	6,7	66 \pm 17	2,5
6 β -OHT	411 \pm 78	6,0	211 \pm 32	7,9
16 α -OHT	1837 \pm 527	26,5	822 \pm 182	30,7
16 β -OHT	14 \pm 5	0,2	20 \pm 9	0,8
2 α -OHT	2064 \pm 573	29,8	857 \pm 189	32,3
2 β -OHT	48 \pm 7	0,7	62 \pm 20	2,3
A-dion	2029 \pm 344	29,3	517 \pm 109	19,5
Summe	6911 \pm 16311	100,0	2655 \pm 627	100,0

Tab. 4.2: Cytochrom P450 abhängiger Testosteron-Metabolismus in PC- und NPC-Mikrosomen aus unvorbehandelten Ratten

Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus 3 Versuchen. Bei der HPLC-Trennung der Inkubations-extrakte konnten 2 β - und 11 β -, bzw. 6 β - und 19- jeweils nicht voneinander getrennt werden.

A-dion=4-Androsten-3,17-dion; OHT = Hydroxytestosteron; [%] = prozentualer Anteil am Gesamtumsatz

Übereinstimmend mit den Literaturangaben beträgt das Verhältnis in NPC-Mikrosomen aus Kontrollratten 16 α -OHT/2 α -OHT/Androstendion (1/1/0,7), während bei den PC-Mikrosomen durch erhöhte Bildungsrate von Androstendion eine leichte Abweichung (1/1/1) festgestellt wurde (Kamatagi et al., 1982).

4.1.4 Testosteron-Metabolismus in Mikrosomen aus PC und NPC von vorbehandelten Ratten

Nach Behandlung der Tiere mit PB stieg der Gesamtumsatz bei PC nur um das 1,5-fache und bei NPC um das 3-fache gegenüber der kontrollsituation an, während die Behandlung mit PB bei PC- und NPC-Mikrosomen zu einem 102-fach bzw. 60-fach stärkeren Umsatz von 16 β -OHT führte (Tabelle 4.3). Darüber hinaus wurde nach PB-

Induktion in Mikrosomen der beiden Zelltypen ein Anstieg der Aktivität vor allem der Aktivität der 2 β - und 6 β -Testosteronhydroxylase sowie eine Abnahme der Aktivität der 2 α -Testosteronhydroxylase nachgewiesen.

In Mikrosomen von Tieren nach Behandlung mit 3-MC kam es zu einer Steigerung des Testosteron-Gesamtumsatzes um den Faktor 1,3. Stärker war die Erhöhung der 7 α -, 2 β - und 15 β -Testosteronhydroxylase-Aktivität (Tabelle 4.3), die auf die bevorzugte Induktion der CYP2A1, CYP1A und CYP3A1 zurückzuführen ist (Nagata et al., 1987). Hingegen war der Gesamtumsatz in NPC Mikrosomen nach 3-MC um den Faktor 0,93 niedriger als in Kontrollmikrosomen. Dabei wurde in NPC-Mikrosomen eine leichte Abnahme der 7 α -OHT-Bildung und eine leichte Zunahme der 15 β -, 6 β - und 2 β -OHT-Bildung festgestellt (Tabelle 4.4).

Die Behandlung der Ratten mit Isosafrol, einen Induktor der CYP1A-Subfamilie (vor allem von 1A2), führte in PC-Mikrosomen zu einer signifikant verringerten Bildungsrate von Umsatzprodukten des CYP2C11, nämlich Androstendion, 2 α - und 16 α -OHT, während die Bildungsrate von 16 β -, 2 β -, 15 β -, 7 α -, 6 β - und 6 α -OHT zunahm. Dadurch blieb der Gesamtumsatz der Testosteronhydroxylierung unverändert gegenüber den Kontrollmikrosomen. NPC-Mikrosomen nach Behandlung mit Isosafrol wiesen jedoch einen 3,6-fach höheren Gesamtumsatz gegenüber den Kontrollmikrosomen auf. Im einzelnen stellte das 16 β -OHT, wie auch in PC-Mikrosomen, das Hauptprodukt dar, gefolgt von 6 β -OHT, welches ein spezifisches Produkt des CYP1A2 ist (Wood et al., 1985).

Die Behandlung männlicher Ratten mit Aroclor 1254 führte bei PC-Mikrosomen zu einer 1,5-fachen Steigerung des Gesamtumsatzes. Aroclor 1254 gilt als Breitspektruminduktor, der die Eigenschaften von PB und 3-MC besitzt. Zum einen wurde ein 75-facher Anstieg von 16 β -OHT gegenüber den Kontrolltiere festgestellt. Dies läßt sich hauptsächlich auf eine Induktion des PB-induzierbaren CYP2B1/2 zurückzuführen. Zum anderen sind 7 α -OHT und 2 β -OHT um den Faktor 3,2 bzw. 9,5 als Folge der Induktion von CYP2A1 und CYP1A1/2 erhöht. Außerdem wurde eine leichte Steigerung der 6 β -, 15 β -, 16 α - und 2 β -Testosteronhydroxylase-Aktivitäten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde die Bildungsrate von 2 α -OHT auf das 0,74-fache verringert.

Die Induktion mit Aroclor 1254 führt in den Mikrosomen der NPC, zu einer gleichen Hydroxylierungsmuster wie in Falle von PC. Eine Ausnahme war der Umsatz von 2 α -OHT, das ausschließlich durch die katalytische Aktivität von CYP2C11 gebildet wird. Dieser wurde in PC um den Faktor 0,74 verringert, während die Bildung in NPC um etwa das 2,2-fache zunahm. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit Ausnahme von 3-MC nach Vorbehandlung der Gesamtumsatzes in NPC stärker zunimmt (Faktor 3,0) als in PC (Faktor 1,3).

Metabolit	Kontrolle	Phenobarbital	3-Methylcholanthren	Isosafrol	Aroclor 1254
6 α -OHT	38 \pm 3 (0,5)	96 \pm 22 (0,9)	81 \pm 12 (0,9)	112 \pm 17 (1,6)	114 \pm 17 (1,1)
IF		2,5	2,1	3,0	3,0
15 β -OHT	20 \pm 8 (0,3)	170 \pm 57 (1,6)	48 \pm 6 (0,5)	129 \pm 50 (1,8)	111 \pm 7 (1,1)
IF		8,5	2,4	6,5	5,6
7 α -OHT	464 \pm 88 (6,7)	1014 \pm 199 (9,7)	1084 \pm 548 (11,9)	2052 \pm 625 (28,9)	1477 \pm 311 (14,3)
IF		2,2	2,3	4,4	3,2
6 β -OHT	411 \pm 78 (5,9)	1513 \pm 452 (14,5)	852 \pm 246 (9,4)	1472 \pm 262 (20,8)	1225 \pm 158 (11,9)
IF		3,7	2,1	3,6	3,0
16 α -OHT	1837 \pm 527 (26,6)	2609 \pm 789 (24,9)	1799 \pm 129 (19,8)	878 \pm 126 (12,4)	2458 \pm 564 (23,5)
IF		1,4	1,0	0,5	1,3
16 β -OHT	10 \pm 3 (0,2)	1019 \pm 312 (9,7)	20 \pm 6 (0,2)	518 \pm 81 (7,3)	751 \pm 120 (7,3)
IF		101,9	2,0	51,8	75,1
2 α -OHT	2064 \pm 573 (29,8)	1417 \pm 456 (13,5)	1948 \pm 140 (21,5)	475 \pm 153 (6,7)	1534 \pm 500 (14,9)
IF		0,7	0,9	0,2	0,7
2 β -OHT	48 \pm 7 (0,7)	437 \pm 139 (4,2)	251 \pm 50 (2,8)	449 \pm 122 (6,3)	455 \pm 30 (4,4)
IF		9,1	5,2	9,4	9,5
A-dion	2029 \pm 344 (29,3)	2187 \pm 363 (20,9)	2990 \pm 867 (33,0)	1002 \pm 60 (14,1)	2183 \pm 252 (21,2)
IF		1,1	1,5	0,5	1
Summe	6920 \pm 1631 (100)	10462 \pm 2789 (100)	9073 \pm 2004 (100)	7087 \pm 1496 (100)	10308 \pm 1959 (100)
IF		1,5	1,3	1,0	1,5

Tab. 4.3: Cytochrom P450-abhängiger Testosteron-Metabolismus in PC-Mikrosomen aus unbehandelten und mit Enzyminduktoren vorbehandelten männlichen Sprague-Dawley Ratten

Angegeben sind die Mittelwerte der Ergebnisse von drei Tieren (pmol/min*mg). Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil am Gesamtumsatz an. Der Induktionsfaktor (IF) stellt den Quotienten zwischen der in PC-Mikrosomen vorbehandelter Tiere gemessenen Aktivität und der Aktivität in Kontrollmikrosomen dar.

Metabolit	Kontrolle	Phenobarbital	3-Methylcholanthren	Isosafrol	Aroclor 1254
6 α -OHT	57 \pm 35 (2,1)	71 \pm 10 (0,9)	78 \pm 19 (3,2)	84 \pm 3 (0,9)	205 \pm 49 (3,1)
IF		1,3	1,4	1,8	3,6
15 β -OHT	43 \pm 34 (1,6)	96 \pm 23 (1,2)	136 \pm 103 (5,5)	147 \pm 6 (1,6)	57 \pm 24 (0,8)
IF		2,2	3,2	3,4	1,3
7 α -OHT	66 \pm 17 (2,5)	442 \pm 29 (5,6)	31 \pm 7 (1,3)	554 \pm 12 (5,8)	494 \pm 9 (7,4)
IF		6,7	0,5	8,4	7,5
6 β -OHT	211 \pm 32 (7,9)	1092 \pm 275 (13,9)	396 \pm 316 (16,0)	3029 \pm 341 (31,9)	763 \pm 368 (11,4)
IF		5,2	1,9	14,4	3,6
16 α -OHT	822 \pm 182 (30,7)	2082 \pm 534 (26,4)	737 \pm 256 (29,9)	1700 \pm 153 (17,9)	1494 \pm 872 (22,2)
IF		2,5	0,9	2,1	1,8
16 β -OHT	20 \pm 9 (0,8)	1159 \pm 460 (14,7)	58 \pm 18 (2,4)	830 \pm 132 (8,7)	544 \pm 457 (8,1)
IF		57,6	2,9	41,5	27,2
2 α -OHT	857 \pm 189 (32,3)	794 \pm 40 (10,1)	515 \pm 205 (20,9)	897 \pm 31 (9,4)	1840 \pm 486 (27,4)
IF		0,9	0,6	1,1	2,2
2 β -OHT	62 \pm 20 (2,3)	384 \pm 138 (4,9)	116 \pm 56 (4,7)	836 \pm 55 (8,8)	172 \pm 64 (2,6)
IF		6,2	1,9	13,5	2,8
A-dion	517 \pm 109 (19,5)	1763 \pm 494 (22,4)	402 \pm 144 (16,3)	1433 \pm 87 (15,1)	1152 \pm 682 (17,1)
IF		3,4	0,8	2,8	2,2
Summe	2655 \pm 627 (100)	7881 \pm 2003 (100)	2469 \pm 1124 (100)	9510 \pm 820 (100)	6721 \pm 3011 (100)
IF		3,0	0,9	3,6	2,5

Tab. 4.4: Cytochrom P450-abhängiger Testosteron-Metabolismus in NPC-Mikrosomen aus unbehandelten und mit Enzyminduktoren vorbehandelten männlichen Sprague-Dawley Ratten. Angegeben sind die Mittelwerte der Ergebnisse von drei Tieren (pmol/min.mg⁻¹). Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil am Gesamtumsatz an. Der Induktionsfaktor (IF) stellt den Quotienten zwischen der in NPC-Mikrosomen vorbehandelter Tiere gemessenen Aktivität und der Aktivität in Kontrollmikrosomen dar.

Parallel zur Untersuchung der Testosteronhydroxylierung, insbesondere der Bildungsrate von 2α -OHT, die als Maß für die Aktivität des CYP2C11 dient, wurde dessen Expression auf Proteinebene mittels Westernblotting in Mikrosomen der beiden Zelltypen analysiert (Kap. 3.8.3). Hierbei wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen CYP2C11 nicht nur in PC-Mikrosomen sondern auch in unvorbehandelten NPC-Mikrosomen immunreaktives P-450 nachgewiesen. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung stimmten überein mit den Ergebnissen aus der Aktivitätsbestimmung der Testosteron 2α -Hydroxylase, die zeigten, daß in PC Kontrollmikrosomen mehr Immunreaktive Protein als in vorbehandelten PC-Mikrosomen war aber in NPC-Mirosomen nach Aroclor Induktion unverändert war (nicht gezeigt).

4.1.5 Optimierung der chromatographischen Trennung der AFB₁-Metabolite

Aufgrund seiner hohen Instabilität erwies sich die qualitative und quantitative Bestimmung des durch Mikrosomen entstandenen AFB₁-8,9-Epoxids als problematisch. So wurde gezeigt, daß das AFB₁-8,9-Epoxid spontan oder enzymatisch zu AFB₁-Dihydrodiol (AFB₁-Diol) hydrolysiert und an subzellulären Bestandteilen bindet, wodurch die Detektion des AFB₁-8,9-Epoxids unmöglich gemacht wird. Daher wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die es ermöglichen, das Epoxid indirekt nachzuweisen und zu quantifizieren.

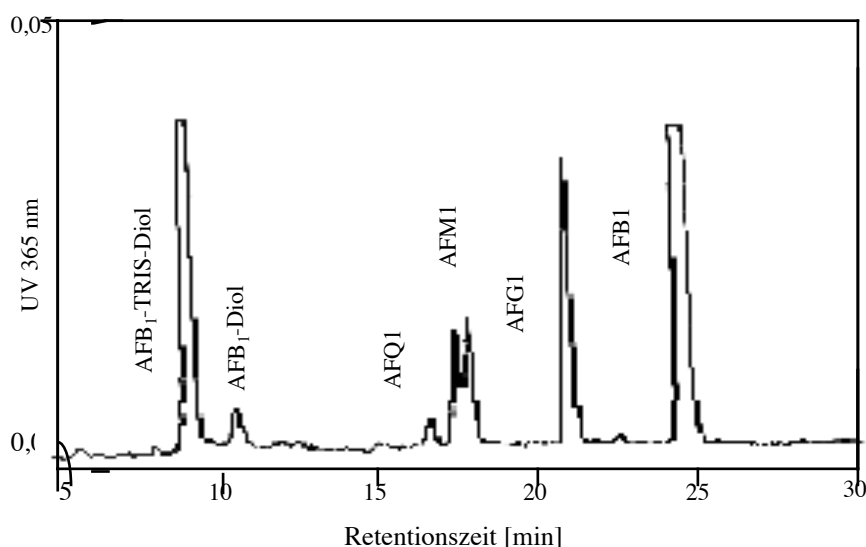


Abb.4.2: RP-HPLC Chromatogramm der AFB₁-Metabolite nach Inkubation

von AFB₁ mit Mikrosomen in Anwesenheit von TRIS/HCl Puffer (pH 7,4).

Die Inkubation enthielt NADPH und PC-Mikrosomen aus Aroclor behandelten Tieren sowie TRIS/HCl Puffer (100 mM, pH 7,4) in Abwesenheit von Cytosol und GSH. AFG₁ wurde als Interner Standard (IS) verwendet.

Wird die Aktivierung von AFB₁- mit Mikrosomen in Anwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems und von TRIS-Puffer (pH 7,4) durchgeführt, so entsteht aus dem halbacetal AFB₁-Diol und der Aminogruppe der TRIS-base die stabile und im UV-detektierbaren Schiffische Base AFB₁-TRIS-Diol. Wie Abb. 4.2 zeigt, wurde in der Inkubation mit TRIS-Puffer ein Hauptpeak der auf AFB₁-TRIS-Diol hindeutet, sowie das Hydrolyseprodukt AFB₁-dhd detektiert. Wurde statt TRIS Phosphat-Puffer als Inkubationsmedium verwendet, so wurde das AFB₁-Diol in geringerer Menge nachgewiesen, was auf eine kovalente Bindung von AFB₁-Diol an das mikrosomale Protein hinweist. Zusätzlich wurde Aflatoxin B_{2α} (8-Hydroxy-8,9-dihydroaflatoxin, AFB_{2α}) durch kochromatographie und mit authentischen Referenzsubstanz nachgewiesen (Abb. 4.3).

Ein Nachteil bei der Verwendung von TRIS-Puffer als Abfänger für das Epoxid bestand darin, daß neben dem Hauptpeak (AFB₁-TRIS-Diol) ebenfalls in geringerer Menge noch vorhandene AFB₁-Diol die Quantifizierung des Epoxids erschwert.

Die indirekte Quantifizierung läßt sich verbessern, wenn das durch Mikrosomen gebildete AFB₁-8,9-Epoxid als GSH-Konjugat abgefangen wird (Degen und Neumann, 1981; Eaton et al., 1989). Dafür wurden Inkubationen durchgeführt, in denen die mikrosomale Fraktion der Ratte mit Lebercytosol aus BHA-behandelten Mäusen, das bekannterweise eine sehr hohe GST-Aktivität besitzt, sowie 5 mM GSH zugesetzt war. Dabei katalysieren die im Lebercytosol befindlichen GSTs die Konjugation des Epoxids mit GSH. So wurde quantitative mehr Epoxid nachgewiesen und in der HPLC-Chromatogramme nur ein Peak eluiert, während das AFB₁-Diol kaum mehr detektiert werden konnte, was auf eine schnelle und vollständige Konjugation des gebildeten Epoxids hindeutet (Abb. 4.4).

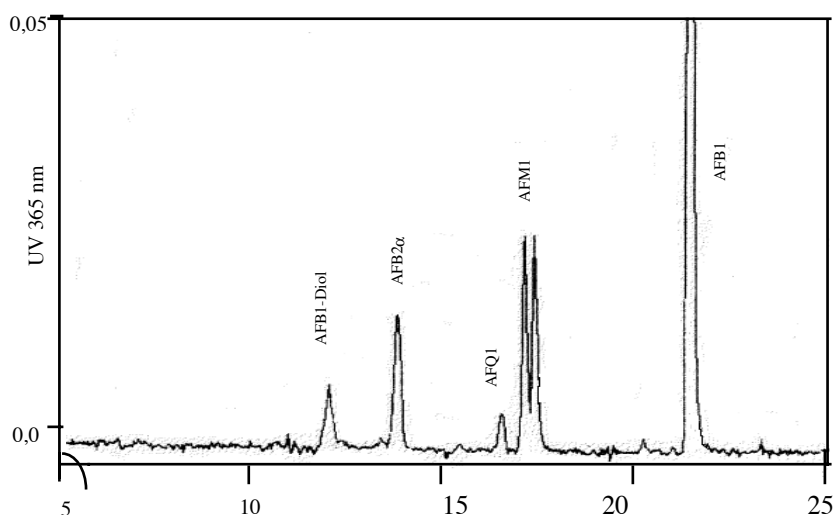


Abb. 4.3: RP-HPLC Chromatogramm der AFB₁-Metabolite nach Inkubation von von AFB₁ mit Mikrosomen aus aroclor vorbehandelten Ratten in Phosphat-Puffer(72 mM, pH 7,4) in Anwesenheit Cytosol und GSH.

Wie schon in der Literatur öfter gezeigt wurde, führt der Zusatz von Cytosol aus Rattenleber oder die Aktivierung durch postmitochondrialen Fraktion der Rattenleber zu einer höheren metabolischen Umsatzrate als die mikrosomale Fraktion alleine (Platt, 1986).

Zur Optimierung der Umsatzbedingungen wurde die Proteinmenge der cytosolischen Fraktion aus Mausleber ermittelt, die benötigt wurde, um das durch Rattenmikrosomen gebildete AFB₁-8,9-Epoxid in Anwesenheit von 5 mM GSH in Form seines GSH-Konjugats abzufangen. Dabei sollte das gebildete Epoxid vollständig abgefangen werden, ohne daß die Bildung von anderen Metaboliten, wie AFM₁ und AFQ₁, beeinträchtigt wurden. Es wurde daher die Menge an mikrosomaler Fraktion auf 2 mg Protein/ml konstant gehalten und in Anwesenheit unterschiedlicher Proteinmengen (1,0–5,0 mg) von Mauscytosol unter Zusatz von NADPH-regenerierendem System, 5 mM GSH und 128 µM AFB₁ für 15 min bei 37 °C inkubiert.

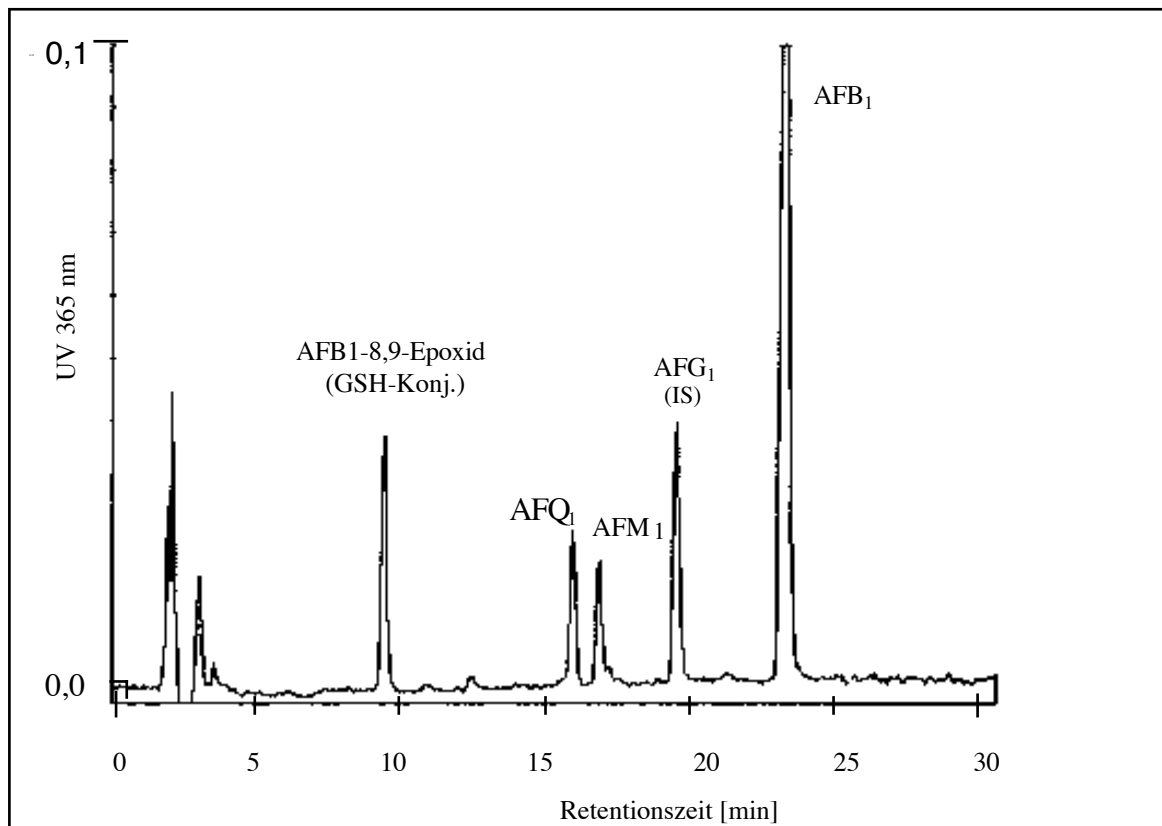


Abb. 4.4 RP-HPLC Metabolitenprofil nach Inkubation von AFB₁ [128µM] mit PC- Mikrosomen aus einer Phenobarbital Induzierten Ratten.

HPLC-Bedingungen: Spherisorb RP-18 (5µm), 4 x250 mm; Mobile Phase:

A: Methanol : Acetonitril, 1:1,v/v) B: Ammoniumacetat (20 mM, pH 3,5) Gradientelution 10 % A in 2 min auf 24 %, in 10 min auf 38% und in 25 min auf 55% und in 35 min auf 100%. Flußrate 0,8 ml/min. AFG₁ wurde als Interner Standard (IS) verwendet.

Aus Abb. 4.6-C (S.65) erkennt man, daß die Bildung von AFB₁-8,9-GSH-Konjugat bei einer Proteinkonzentration von bis zu 3 mg der cytosolischen Fraktion/ml linear verläuft.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde dann für die darauffolgenden Untersuchungen das Verhältnis zwischen mikrosomalen und cytosolischen Mikrosomen Protein auf 2:3 festgelegt (Abb. 4.6-B und 4.6-C).

Bei der Verwendung von Mauscytosol als AFB₁-8,9-Epoxid-Abfänger wurden zusätzliche Vorkehrungen getroffen, um die kleinsten Spuren einer Verunreinigung durch die mikrosomale Fraktion zu vermeiden. Dazu wurde das Cytosol als Überstand nach zwei Zentrifugationsschritten der Postmitochondrialen Fraktion bei 100 000 x g gewonnen.

Wie in Kap. 3.1 beschrieben wurde die hier eingesetzte cytosolische Fraktion aus BHA vorbehandelten CD-1 Mäusen präpariert. Der Erfolg der Induktion der cytosolischen Glutathion-S-transferasen wurde mit Hilfe eines Breitspektrumssubstrats, CDNB, überprüft. Dies ergab einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität (8,17 $\mu\text{mol}/\text{mg}\times\text{min}$) gegenüber der Kontrolle (3,52 $\mu\text{mol}/\text{mg} \times \text{min}$).

Versuche, in denen AFB₁ in Abwesenheit von Mikrosomen aber unter Zusatz von Lebercytosol aus BHA-Mäusen und von allen anderen Kofaktoren unter gleichen Bedingungen inkubiert und aufgearbeitet wurde, zeigten erwartungsgemäß keine metabolische Umsetzung von AFB₁. Ebenfalls zeigten Inkubationen mit Mikrosomen in Abwesenheit des NADPH-regenerierenden Systems keine Umsetzung von AFB₁.

4.1.6 Identifizierung des AFB₁-8,9-Epoxid-Glutathion-Konjugats

Zur Identifizierung des gebildeten AFB₁-8,9-Epoxid-Glutathion-Konjugate, stand der im Labor von A. Seidel, Institut für Toxikologie der Universität Mainz, synthetisch hergestellten AFB₁-8,9-Epoxid-GSH Referenzsubstanz 8,9-Dihydro-8-(S-glutathionyl)-9-hydroxy-aflatoxin B₁ zur Verfügung. Dazu wurde die Identität des synthetisch hergestellten AFB₁-8,9-Epoxid-GSH-Konjugate und des im Metabolismus entstandenen Konjugate durch Co-chromatographie und Aufnahme der UV-Spektren im Diodenarray Detektor bestätigt (Kap. 3.7.3). Es wurde festgestellt, daß die Referenzsubstanz unter dem gewählten RP-HPLC Bedingungen bei der gleichen Retentionszeit wie das während der Biotransformation entstandene Stoffwechselprodukt eluiert wurde. Außerdem wurde eine bis zu 99% Übereinstimmung von UV-Spektren zwischen Referenzsubstanz und Metabolit nach Überlagerung von UV-Spektren festgestellt (Abb. 4.5), das auf das gleiche π -Elektronen-System hinweist.

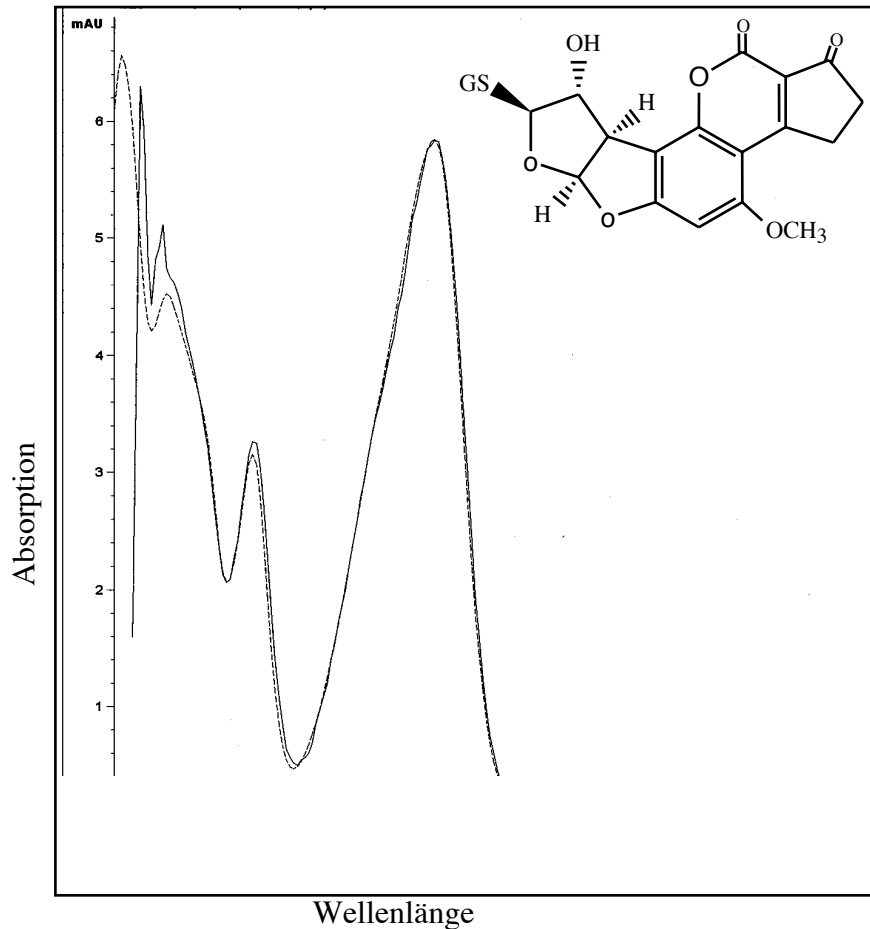


Abb.4.5 : Vergleich der UV-Spektren des synthetisch hergestellten und des metabolisch gebildeten GSH-Konjugates des AFB₁-8,9-Epoxids (8,9-Dihydro-8-(S-glutathionyl)-9-hydroxy-aflatoxin B₁). HPLC-Bedingungen Abb. 4.4

4.1.7 Zeit -und Proteinabhängigkeit des metabolischen Umsatzes von AFB₁

Zur Feststellung der Zeitabhängigkeit des AFB₁-Metabolismus wurden PCMikrosomen mit AFB₁ (128 μ M) für 5 bis 60 Minuten inkubiert, die entstandenen Metaboliten extrahiert, HPLC-chromatographisch getrennt und quantifiziert. Die Zeitabhängigkeit der Metabolitenbildung ist in [Abb. 4.6 A](#) dargestellt. Im Zeitbereich zwischen 0 und 15 Minuten konnte ein linearer Anstieg der Bildung von AFM₁ und AFQ₁ beobachtet werden. Danach verlangsamte sich die Umsetzung und erreichte ein Plateau. Im Gegensatz dazu stieg die Bildung von AFB₁-8,9-Epoxid bis zur Inkubationszeit von 60 Minuten kontinuierlich an. [Abb. 4.6 B](#) zeigt die Bildung der Metabolite von AFB₁ in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinmenge bei einer Inkubationsdauer von 20 min. Die Ergebnisse illustrieren, daß die Bildung aller drei Metabolite nur bis zu einer Proteinkonzentration von 2 mg /ml linear verläuft. Da die metabolische Umsetzung von AFB₁ bis zu einer Proteinmenge von 2 mg/ml und bis zu einer Inkubationszeit von 15 min annähernd linear verlief, wurden in den folgenden Experimenten diese Inkubationsbedingungen gewählt.

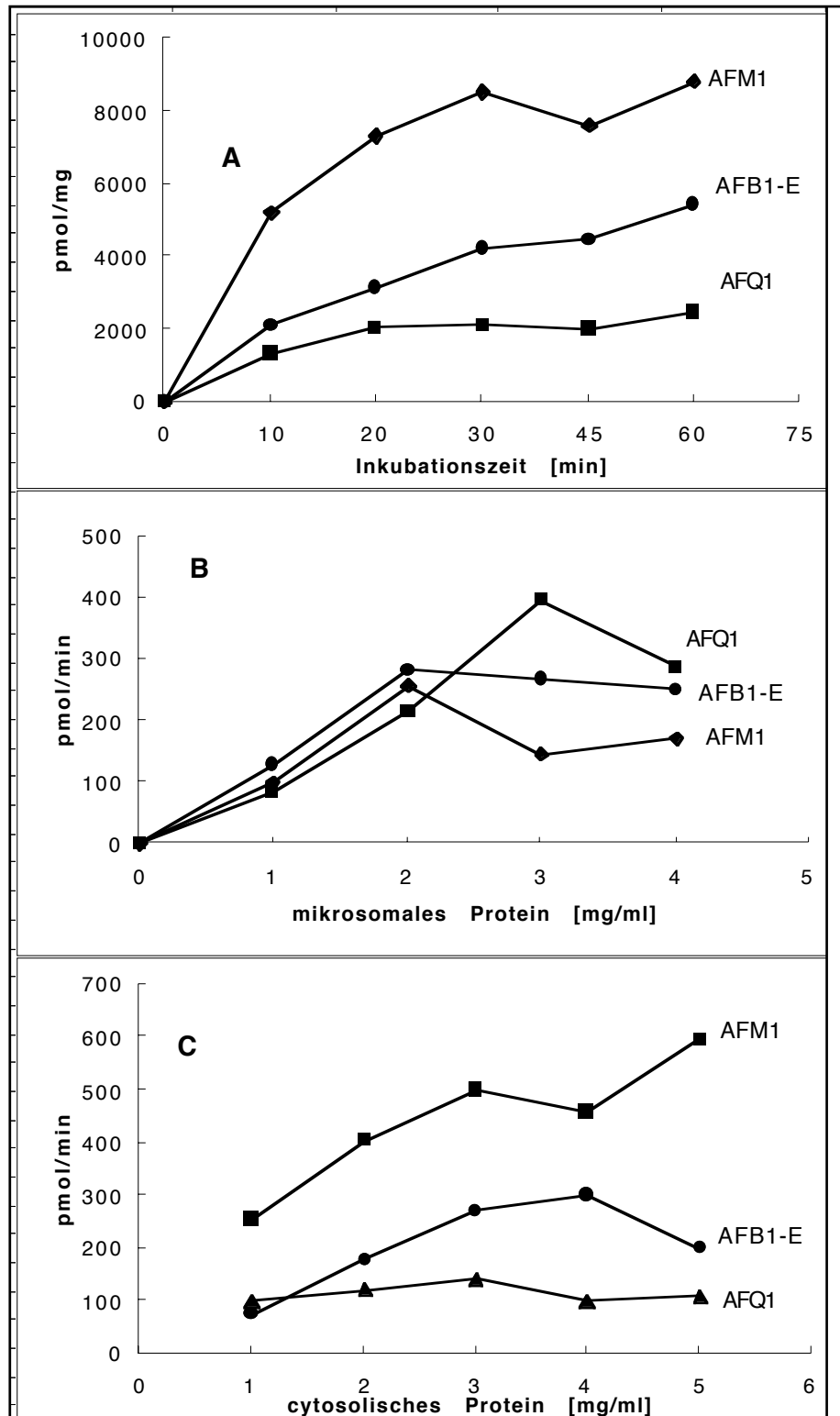


Abb. 4.6: Abhängigkeit der Cytochrom P450-abhängigen Metabolisierung von AFB₁ [128 μ M] in Anwesenheit von PC-Mikrosomen aus Aroclor Induktion von der Inkubationszeit (A) und von PC-Mikrosomen aus Isosafrol Induktion von der Proteinmenge (B). Inkubation von AFB₁ [128 μ M] mit PC-Mikrosomen aus 3-MC behandelten Ratten in Anwesenheit von cytosolischem Protein aus BHA-Mäusen (C) (siehe Seite 64).

4.1.8 Metabolismus von AFB₁ durch Mikrosomen aus PC und NPC der Rattenleber

Zur Untersuchung der metabolischen Umsetzung von AFB₁ in PC- und NPC-Mikrosomen aus PC und NPC der Rattenleber wurden sowohl niedrige, d.h. nicht-sättigende als auch höhere, sättigende Substratkonzentrationen von AFB₁ eingesetzt. Bei der niedrigen Konzentration von 16 μM AFB₁ handelt es sich um die Menge von AFB₁, die in Nahrungsmitteln nach Kontamination mit Afaltoxinen vorkommende Konzentration annähernd widerspiegelt. Bei der höheren Substratkonzentration von AFB₁ [128 μM] wird eine Enzymsättigung durch das Substrat erreicht.

Hierzu wurden jeweils Mikrosomen aus isolierten PC oder NPC der Ratte mit 16 μM oder 128 μM AFB₁, 5 mM GSH sowie NADPH-regenerierendes System unter zusätzlicher Anwesenheit von Lebercytosol aus BHA vorbehandelten Mäusen inkubiert, aufgearbeitet und die Metabolite anschließend über RP-HPLC chromatographisch getrennt. Mit Hilfe der dabei erhaltenen UV-Chromatogramme wurden die metabolischen Produkte nachgewiesen. Die Identifizierung aller Metabolite erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeit und Co-Chromatographie sowie durch den UV-Spektrenvergleich mit den zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen. Die quantitative Auswertung der gebildeten Metabolite erfolgte unter Verwendung einer Eichgerade, wobei AFG₁ als interner Standard eingesetzt wurde.

Induktionsform	Metabolitenbildung		
	pmol/min x mg Protein		
	AFM ₁	AFQ ₁	AFB ₁ -E ^a
Unbehandelte	31 ± 13	41 ± 14	71 ± 26
Phenobarbital	82 ± 29 *	145 ± 74 *	200 ± 93*
3-Methylcholanthren	320 ± 59 *	40 ± 9	72 ± 17
Isosafrol	114 ± 21 *	155 ± 39*	195 ± 47*
Aroclor 1254	408 ± 140 *	100 ± 34 *	181 ± 54*

Tab. 4.5: Cytochrom P450 abhängige metabolische Bildung von AFM₁, AFQ₁ und AFB-E nach Inkubation von AFB₁ [128 μM] mit PC-Mikrosomen aus der Leber unterschiedlich vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SD aus 3-5 Versuchen dar

* Statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$, Dunnett's Test)

^a AFB-E (AFB₁-8,9-Epoxid) wurde in Form seines GSH-Konjugats abgefangen

Bei Inkubationen von AFB₁ (128 μM) mit PC-Mikrosomen sowie mit NPC-Mikrosomen aus unbehandelten Ratten konnten als wichtige Metabolite der Phase-I Biotransformation zwei hydroxylierte Metabolite von AFB₁, nämlich AFM₁ und AFQ₁, sowie das enzymatische Aktivierungsprodukt AFB₁-8,9-Epoxid, als GSH-Konjugat

nachgewiesen werden. Dabei fällt auf, daß AFB₁-8,9-Epoxid der Hauptmetabolit der PC-Mikrosomen aus Kontrolltieren war, gefolgt von AFQ₁ und AFM₁, die etwa in vergleichbarer Menge gebildet wurden.

Bei Inkubationen von AFB₁ (128 µM) mit NPC-Mikrosomen aus unbehandelten Ratten ist dagegen das AFB₁-8,9-Epoxid nicht der Hauptmetabolit. Dies ist wahrscheinlich auf den niedrigen CYP-Gehalt in NPC zurückzuführen. Stattdessen wurde nach Inkubation von AFB₁ (128 µM) mit NPC-Mikrosomen eine relativ hohe AFM₁- und AFQ₁-Bildungsrate festgestellt (Tab. 4.6). Die metabolische Bildung von AFP₁, das durch O-Demethylierung von AFB₁ entsteht, konnte in Mikrosomen der beiden Zelltypen bis zu Detektionsgrenze von 5 pmol nicht nachgewiesen werden.

Induktionsform	Metabolitenbildung		
	pmol/min x mg Protein		
	AFM ₁	AFQ ₁	AFB-E ^a
Unbehandelte	40 ± 18	37 ± 8	47 ± 18
Phenobarbital	52 ± 18	87 ± 25	85 ± 16*
3-Methylcholanthren	118 ± 21*	56 ± 14	107 ± 33*
Isosafrol	274 ± 74*	119 ^b	198 ^b
Aroclor 1254	95 ± 33*	51 ± 3	80 ± 32*

Tab. 4.6: Cytochrom P450 abhängige metabolische Bildung von AFM₁, AFQ₁ und AFB-E nach Inkubation von AFB₁ [128 µM] mit NPC-Mikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SD aus 3-4 Versuchen dar Ausnahme:

^b Mittelwerte aus 2 Versuchen

* Statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (p<0,05, Dunnett's test)

^a AFB-E wurde in Form seines GSH-Konjugats abgefangen

Vorbehandlung der Ratten mit allen vier Enzyminduktoren führte bei PC-Mikrosomen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Bildung von AFM₁, während die Bildung sowohl von AFB₁-8,9-Epoxid als auch von AFQ₁ nur nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und Isosafrol sowie Aroclor erhöht wurde. Auffallend war, daß 3-Methylcholanthren behandelte PC Mikrosomen eine um den Faktor 10,5 erhöhte Menge an AFM₁ bildeten, ohne daß die Metabolitenbildung von AFQ₁ und AFB-E beeinflusst wurde. Eine etwa 13-fach erhöhte Bildung von AFM₁ wurde auch nach Aroclor Induktion beobachtet. Diese erhöhte Bildungsrate von AFM₁ durch 3-MC und Aroclor läßt sich auf der Induktion des AFB₁-9a-Hydroxylase zurückführen. Andererseits stieg die Menge an AFQ₁ und AFB-E durch Aroclor um den Faktor 2,5 an, ähnlich wie bei PB-induzierten Mikrosomen. Da Aroclor 1254 Induktionseigenschaften von PB- und 3-MC vereint, ist dieser Effekt durch die PB induzierbaren Enzyme zu erklären. Die durch Isosafrol

induzierten PC-Mikrosomen zeigten eine mäßige Aktivierungsrate von AFB₁ zum Epoxid sowie eine durchschnittlich um den Faktor 3,8 erhöhte Bildungsrate von AFM₁ und AFQ₁.

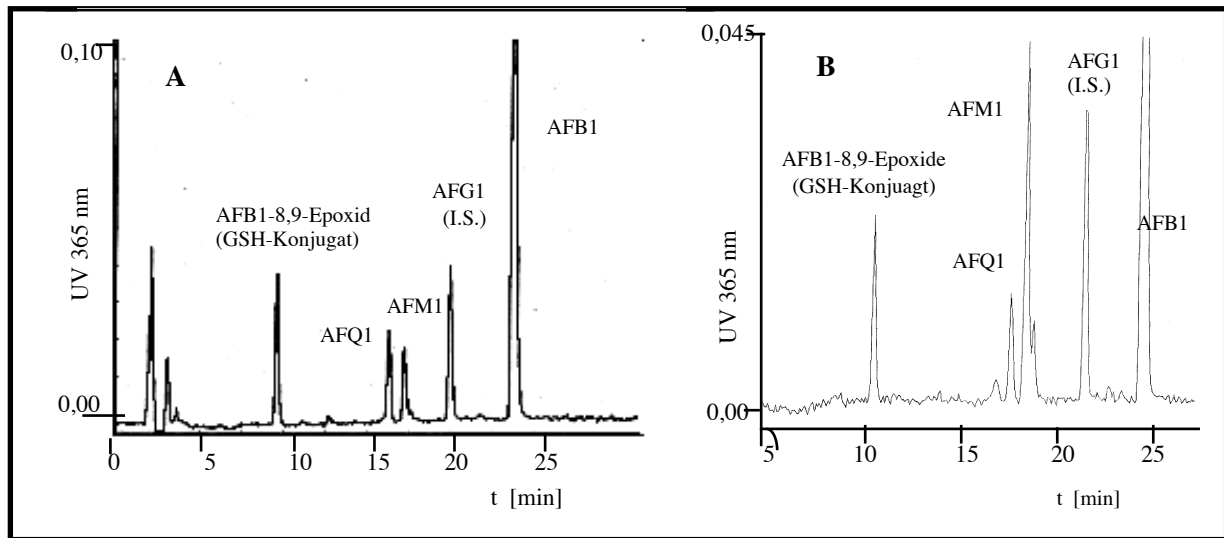


Abb.4.9: RP-HPLC Chromatogramm nach Inkubation von AFB₁ mit PC-Mikrosomen (A) und mit NPC-Mikrosomen (B) aus Phenobarbital-Induktion.

HPLC-Bedingungen: Spherisorb RP-18 (5µm), 4 x250 mm; Mobile Phase: A: Methanol : Acetonitril, 1:1,v/v) B: Ammoniumacetat (20 mM, pH 3,5) Gradientelution von 10 % A in 2 min auf 24 %, in 10 min auf 38% und in 25 min auf 55% und in 35 min auf 100%. Flußrate 0,8 ml/min.

Im Gegensatz zu PC-Mikrosomen führte eine Enzyminduktion mit Isosafrol bei NPC zu einem stärkeren Anstieg der AFB₁-8,9-Epoxid-Bildung. Im Vergleich zu den Kontrollmikrosomen wurde die AFQ₁- bzw. AFM₁-Bildungsrate um 3,2 bzw 6,9 fach erhöht.

Induktionsform	Metabolitenbildung		
	AFM ₁	AFQ ₁	AFB ₁ -E ^a
Unbehandelte	12 ± 4	7 ± 8	27 ± 4
Phenobarbital	16 ^c	15 ± 25 [*]	45 ± 8 [*]
3-Methylcholanthren	85 ± 15 [*]	8 ± 4	32 ± 4
Isosafrol	49 ± 6 [*]	16 ± 3 [*]	48 ± 6 [*]
Aroclor 1254	122 ± 4 [*]	11 ± 3	48 ± 5 [*]

Tab. 4.7: Cytochrom P450 abhängige metabolische Bildung von AFM₁ AFQ₁ und AFB₁-E nach Inkubation von AFB₁ [16 µM] mit PC-Mikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SD aus 3-4 Versuchen dar

^{*} Statistisch signifikant im Vergleich zu Kontrolle (p<0,05, Dunnett's Test)

^a AFB₁-E wurde in Form seines GSH-Konjugats abgefangen; ^c Mittelwerte aus 2 Versuchen

Wurde AFB₁ bei niedriger Konzentration (16 µM) mit PC-Mikrosomen inkubiert, die sowohl aus Kontrolltiere als auch aus mit verschiedenen Induktoren behandelten Tieren präpariert worden waren, so konnten qualitativ ähnliche Metabolitenprofile wie bei der hohen AFB₁ Konzentration beobachtet werden. Es wurden in Kontrollmikrosomen jeweils etwa 40 % der Menge an AFB₁-8,9-Epoxid und AFM₁ sowie 17% der Menge an AFQ₁ im Vergleich zur AFB₁-Konzentration von 128 µM gebildet (Tab. 4.7).

Nach Inkubation von AFB₁ in der niedrigen, nicht sättigender Konzentration mit NPC-Kontrollmikrosomen war die AFM₁-Bildung gegenüber der von AFB₁-8,9-Epoxid erhöht (Tab. 4.8). Hingegen ergab die Induktion mit 3-MC, ISO und ARO ein ähnlichen Metabolitenprofil wie bei der höheren AFB₁ Konzentration (128 µM).

Induktionsform	Metabolitenbildung		
	pmol/min x mg Protein		
	AFM ₁	AFQ ₁	AFB ₁ -E ^a
Unbehandelte	26 ± 9	15 ± 5	14 ± 4
Phenobarbital	21 ± 11	29 ± 13	31 ± 8*
3-Methylcholanthren	53 ± 16 *	22 ± 11	35 ± 4*
Isosafrol	78 ± 14 *	41 ± 14 *	39 ± 8*
Aroclor 1254	62 ± 9 *	49 ± 47 *	41 ± 6 *

Tab. 4.8: Cytochrom P450 abhängige metabolische Bildung von AFM₁, AFQ₁, und AFB-E nach Inkubationen von AFB₁ [16 µM] mit NPC-Mikrosomen aus unterschiedlich vorbehandelten und nicht vorbehandelten Ratten

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SD aus 3-4 Versuchen dar

* Statistisch signifikant im Vergleich mit der Kontrolle (p<0,05, Dunnett's test)

^a AFB-E (AFB₁-8,9-Epoxid) wurde in Form seines GSH-Konjugats abgefangen

4.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen AFB₁ und HBV in zwei Tiermodellen für chronisch aktive Hepatitis

4.2.1 Studien in HBV-transgenen-Mäusen und Kontrollmäusen

Die in dieser Arbeit verwendeten HBV-transgenen Mäuse, Linie 50-4, wurden im Labor von Dr. Francis V. Chisari vom Forschungsinstitut der Scripps-Klinik in La Jolla, Kalifornien, erzeugt. Das eingebrachte humane HBV-Genkonstrukt bewirkt eine Überproduktion des großen HBV-Hüllproteins und gleichzeitig eine Akkumulation dieses Proteins in den Hepatozyten. Dies führte bei den Mäusen zur Leberschädigung und dadurch zur Entwicklung einer chronischen aktiven Hepatitis und schließlich zur Bildung von hepatozellulären Karzinomen.

Dazu wurden in subzelluläre Leberfraktionen (Cytosol und Mikrosomen) aus HBV-transgenen Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp präpariert und zunächst die Aktivitäten der fremdstoffmetabolisierenden Enzymen charakterisiert.

4.2.1.1 Cytochrom P450-Gesamtgehalt und die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme

Es wurde ein vergleichbarer Cytochrom P-450-Gesamtgehalt in Mikrosomen der HBV-transgenen Mäuse (0,44 nmol/mg mikrosomales Protein) und Kontrollmäuse (0,49 nmol/mg mikrosomales Protein) festgestellt. Entgegen den Erwartungen wurde sogar eine Tendenz zu geringeren P-450-Aktivitäten bei HBV-transgenen Mäusen festgestellt, was der bisherigen Beobachtung bezüglich der Aktivität von Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen unter Infektionsbedingungen, sowohl bei Versuchstieren als auch beim Menschen, entspricht.

Außerdem wurde untersucht, ob eine Veränderung in der Expression von Cytochrom P-450-Isoenzymen zwischen transgenen HBV-Mäusen und Kontrollmäusen festzustellen war. Zur Überprüfung einer veränderten CYP-Expression wurden die mikrosomalen Aktivitäten der Cumarin-7-hydroxylase (COH), Ethoxycumarin-O-deethylase (ECOD) sowie die Hydroxylierung von Testosteron durch Lebermikrosomen von transgenen HBV-Mäusen und Kontrollmäusen analysiert. Darüber hinaus wurde ein direkter quantitativer und qualitativer Nachweis des CYP2A5-Isoenzym, mittels Western blotting durchgeführt.

Zunächst wurde die enzymatische Aktivität des CYP2A5-Isoenzym wie in Kap. 3.6.3.2 beschrieben mit Hilfe des diagnostischen Modells substrats Cumarin ermittelt. Dabei wird die Oxidation von Cumarin zu 7-Hydroxycumarin, die in der Maus spezifisch durch CYP2A5 katalysiert wird, untersucht. Es wurde keine erhöhte sondern eine reduzierte

Cumarin 7-hydroxylase-Aktivität in HBV-transgenen Mäusen beobachtet. Weiterhin wurde das Substrat 7-Ethoxycumarin eingesetzt. Dieses relativ unspezifische Substrat wird sowohl durch CYP2A5 und CYP2B, aber überwiegend durch CYP1A1 Formen zum 7-Hydroxycumarin demethyliert. In HBV-transgenen Mäusen wurde dieses Produkt in geringeren Mengen als in Kontrollmäusen nachgewiesen (Tab. 4.9)

Versuchstiere	Cumarin-7-hydroxylase ^a	7-Ethoxycumarin O-deethylase ^b
Kontrollmäuse	99 ± 10	3,417 ± 0,324
HBV-transgene Mäuse	77 ± 30	2,256 ± 0,148

Tab.4.9: Aktivität der Cumarin 7-hydroxylase und 7-Ethoxycumarin O-deethylase in mikrosomalen Leberzellfraktionen nach Inkubation mit Cumarin [100 µM] und Ethoxycumarin (80 µM). Angegeben sind Mittelwerte ± SD aus 3 Versuchen

^a pmol 7-Hydroxycumarin/min x mg Protein

^b nmol 7-Hydroxycumarin/min x mg Protein

4.2.1.2 Testosteron Metabolismus in HBV-transgenen und Kontrollmäusen

Untersuchungen der Testosteron-Hydroxylierung haben gezeigt, daß der Gesamtumsatz in Kontrollmäusen 1377 pmol/mg x min betrug. Dieser ist höher als der Wert von 1196 pmol/mg x min bei HBV-transgenen Mäusen. Das Hydroxylierungsmuster war jedoch in beiden Gruppen identisch (Abb. 4.8).

Hauptmetabolite waren 4-Androsten-3,17-dion, 6β- und 2β-OHT, gefolgt von 7α-, 15α- und 6α-OHT. Bei den beiden Versuchsgruppen wurden in gleicher Menge (bis zu 10% der Gesamtumsatz) noch nicht identifizierte Metaboliten gebildet. Der Anteil an 2β-, 15α-, 16β- und 2α-OHT ist besonders in HBV-transgenen Mäusen leicht erniedrigt. 15α-OHT, dessen Bildung durch CYP2A4 katalysiert wird (Negishi et al., 1988), ist besonders interessant, weil diese Isoform aus Mausleber eine hohe Homologie zum CYP2A5 aufweist. Hierbei konnte auch bei HBV-transgenen Mäusen keine erhöhte Bildungsrate von 15α-OHT verzeichnet werden.

4.2.1.3 Western Blot-Analyse des mikrosomalen CYP2A5-Isoenzym

Parallel zu der Bestimmung der Cumarin-7-hydroxylase wurden Versuche unternommen, die Expression von CYP2A5 mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers in mikrosomalen Fraktionen quantitativ und qualitativ direkt nachzuweisen.

Dazu wurde 10 µg mikrosomales Protein aus den jeweiligen Proben über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das immobilisierte Protein wurde mit einem ersten monoklonalen Antikörper behandelt, der in Hühnern generiert worden war.

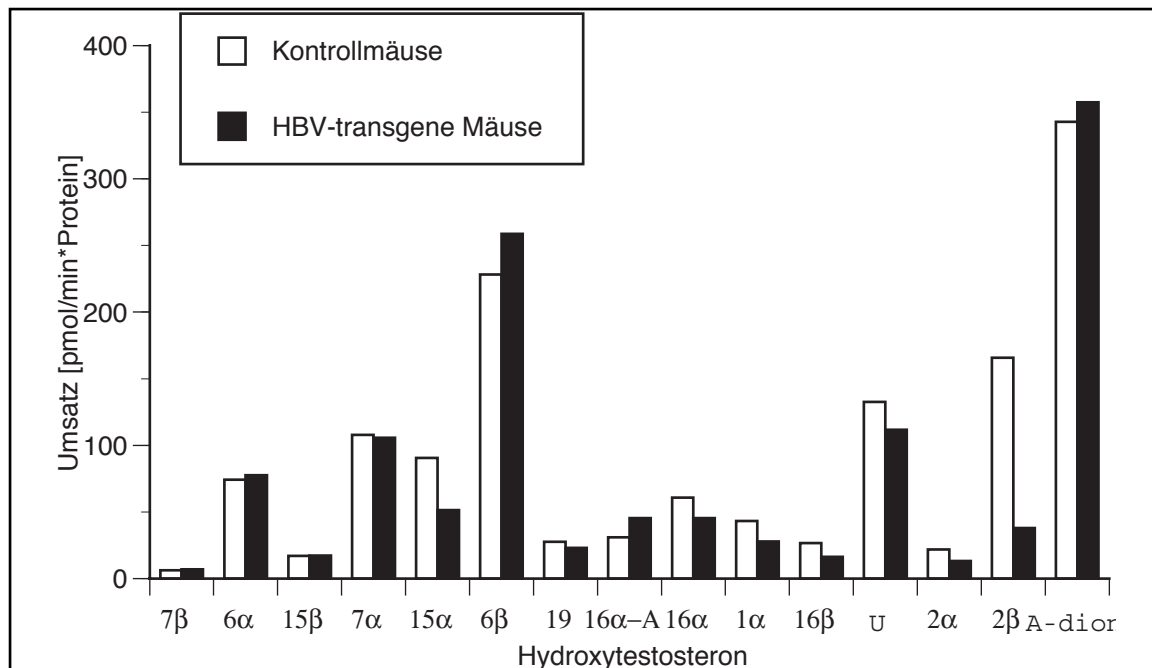


Abb.4.8: Cytochrom P450-abhängiger Testosteron-Metabolismus in Mikrosomen aus HBV-transgenen Mäusen und Kontrollmäusen.

Angegeben sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

U = nicht identifizierte Metabolite; 16α-A = 16α-4-Androsten-3,17-dion

Der zweite Antikörper, der gegen Immunglobuline der Maus gerichtet war, wurde mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert, so daß nach der Enzymreaktion mit einem farbgebenden Substrat (NBT/X-Phosphat) die Komplexe als blaue Banden erscheinen. Abb. 4.9 zeigt eine deutliche Hauptbande im Molekularbereich 50 kDa. Die relative Menge an CYP2A5 in Lebermikrosomen von transgenen HBV-Mäusen und Kontrolltieren ist vergleichbar. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit den Befunden aus den Untersuchungen der Cumarin-7-hydroxylase.

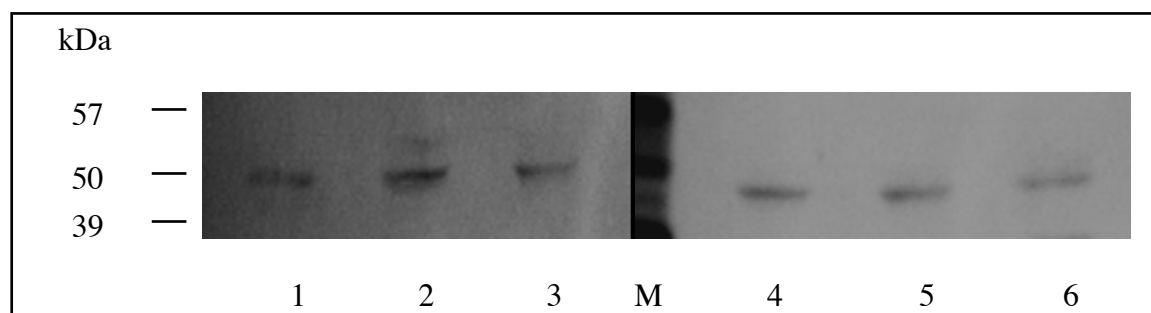


Abb. 4.9: Western Blot Analyse des CYP2A5-Isoenzym in der mikrosomalen Fraktion aus Kontrollmäusen und HBV-transgenen-Mäusen.

(M) Molekulargewichtsmarker, (1), (2) und (3) mikrosomales Protein aus Kontrollmäusen

(4), (5) und (6) mikrosomales Protein aus HBV-transgenen-Mäusen.

Die verwendete Verdünnungen des ersten und zweiten Antikörpers siehe Kap.3.8.3

4.2.1.4 Mikrosomale Epoxidhydrolase und cytosolische Glutathion-S-transferasen

Die Aktivitätsmessung der cytosolischen Glutathion-S-transferasen (cGST) und der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) in beiden Versuchsgruppen war von großer Relevanz, da eine reduzierte Aktivität dieser Enzyme eine verminderte Fähigkeit zur Konjugation bzw. Hydrolyse des reaktiven Zwischenprodukts zur Folge hätte und dementsprechend eine erhöhte Menge des DNA-bindenden AFB₁-8,9-Epoxids entstehen würde. Die Aktivität der mikrosomalen EH wurde in Mikrosomen durch Umsetzung von Styroloxid (STO) zu Styrolglykol bestimmt (Kap. 3.6.4).

Die Aktivitätsbestimmung der cytosolischen GST wurde unter Verwendung von CDNB durchgeführt. CDNB stellt ein Breitspektrum-Substrat für mehrere Isoenzyme der Genfamilie der cytosolischen GSTs dar. (Kap. 3.6.5). Es wurden jedoch keine Unterschiede sowohl in der cGST- als auch in mEH-Aktivität zwischen HBV-transgenen und Kontrollmäusen gefunden (Tab. 4.10).

Versuchstiere	cGST Aktivität ^a	mEH Aktivität ^b
Kontrollmäuse (Wildtyp)	1,82 ± 0,51	2,18 ± 0,61
Transgene HBV-Mäuse	1,89 ± 0,70	1,92 ± 0,30
C57BL/6 Mäuse	2,45 ± 0,67	4,55 ± 0,24

Tab. 4.10: Aktivitäten der mikrosomalen Epoxidhydrolase und der cytosolischen Glutathion-S-transferasen in Leberzellfraktionen von transgenen HBV-Mäusen und Kontrollmäusen

Angegeben sind Mittelwerte ± SD aus 3 Versuchen

a Aktivität der cytosolischen Glutathion S-transferasen in µmol CDNB/mgxmin

b Aktivität der mikrosomalen Epoxidhydrolase in nmol STO/mgxmin

Mikrosomen der C57BL/6 Mäuse sind als Vergleichsmaterial untersucht

4.2.1.5 AFB₁-Metabolismus mit Mikrosomen aus HBV-transgenen-Mäusen und Kontrollmäusen

Epidemiologischen Daten haben gezeigt, daß eine Infektion mit HBV und gleichzeitiger Verzehr von AFB₁-kontaminierten Nahrungsmitteln mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms verbunden sind (Wild et al., 1993). Der Grund für diesen Synergismus ist nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine HBV-induzierte Leberschädigung zu einem veränderten Metabolismus von AFB₁ gegenüber Tieren ohne Leberschäden führen kann.

Dazu wurden in subzelluläre Leberfraktionen (Cytosol und Mikrosomen) aus HBV-transgenen Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp präpariert. Außerdem wurde die mikrosomale Leberfraktion aus C57BL/6-Mäusen als Vergleichsmaterial neben Wildtypkontrollen und HBV-transgenen Mäusen eingesetzt, da das für das HBV-

Hüllprotein kodierende Gen in diesem Mausstamm eingebracht worden war. Zusätzlich wurde die cytosolische Leberfraktion von C57BL/6-Mäusen in allen Inkubationsansätzen zugesetzt, um das durch Mikrosomen aktivierte Epoxid in Anwesenheit von GSH abzufangen.

Nach einer Inkubation von [³H]AFB₁ mit Lebermikrosomen (unter Zusatz von NADPH-regenerierendem System, Lebercytosol aus C57BL/6-Mäusen und 5mM GSH) und nachfolgender Extraktion sowie chromatographischer Trennung der Metabolite wurden die gesammelten Fraktionen radiometrisch quantifiziert. In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse diese Untersuchungen zusammengefaßt.

Es ist zu erkennen, daß von den gebildeten Metaboliten das GSH-Konjugat des AFB₁-8,9-Epoxids am stärksten vertreten war. Das O-demethylierte Produkt AFP₁, das bei Mikrosomen der PC- und NPC der Ratten unter der Nachweisgrenze lag, wurde hier als zweitgrößte Metabolit identifiziert. Daneben traten zwei Hydroxyaflatoxine, AFM₁ und AFQ₁ auf. Aus den dargestellten Daten ist zu erkennen, daß nach HBV-induzierte Leberschädigung keine Zunahme der Bildung von 8,9-Epoxid beobachtet wurde.

Versuchstiere	P-450 Gehalt	AFB ₁ -E	AFQ ₁	AFM ₁	AFP ₁
Kontrollmäuse	0,49 ± 0,01	262 ± 61	62 ± 26	66 ± 5	184 ± 17
HBV-transgene Mäuse	0,44 ± 0,05	268 ± 50	61 ± 8	63 ± 7	177 ± 25
C57BL/6 Mäuse	0,65 ± 0,04	369 ± 46	71 ± 10	74 ± 4	224 ± 12

Tab. 4.11: Vergleich des gesamten mikrosomalen CYP450-Gehalts und metabolische Umsetzung von Aflatoxin B₁ [128 µM] nach Inkubation mit Mikrosomen von HBV-transgenen Mäusen und Kontrollmäusen.

Angegeben sind Mittelwerte ± SD aus 3 Versuchen
 P-450 Gesamtgehalt in nmol/mg mikrosomales Protein
 AFB₁-E, AFQ₁, AFM₁ und AFP₁ sind in pmol/mg Protein x min angegeben.
 AFB₁-E (AFB₁-8,9-Epoxid) wurde in Form seines GSH-Konjugats abgefangen.
 Mikrosomen der C57BL/6 Mäuse sind als Vergleichsmaterial untersucht.

Außerdem konnten keine signifikante Unterschiede zwischen HBV-transgenen Mäusen und Kontrollmäusen bezüglich der Bildung des AFQ₁, AFM₁ und AFP₁ beobachtet werden. Bezieht man die Metabolitenbildungsrate nicht auf mg mikrosomalen Proteins sondern auf nmol P-450, erhält man einen leichten Anstieg in der Aktivierungsrate von AFB₁-8,9-Epoxid auf 604 pmol/nmol P-450 x min AFB₁-GSH-Konjugat bei HBV-transgenen Mäusen gegenüber 535 pmol/nmol P-450 x min bei Wildtypmäusen.

4.2.2 Studien in Virus-infizierten und Virus-freien Waldmurmeltieren

4.2.2.1 Vergleich der Cytochrom P450-abhängigen Enzymaktivitäten und der Aktivität cytosolischer Glutathion-S-transferasen

Zunächst wurde der P-450 Gesamtgehalt der Lebermikrosomen bestimmt. Gegenüber den WHV (engl. Woodchuck Hepatitis Virus)-freien Tieren zeigten die WHV-positiven Tiere mit starker chronisch aktiver Hepatitis einen nahezu 50% niedrigeren Gehalt an P-450, während bei WHV-positiven Tieren mit milder chronisch aktiver Hepatitis ein mit der WHV-negativen Gruppe vergleichbarer Wert erhalten wurde.

Die Aktivität der cytosolischen Glutathion-S-transferase wurde unter Verwendung von CDNB als Substrat bestimmt. Die Bestimmung ergab sowohl in WHV-negativen als auch in WHV-positiven Tieren vergleichbare Werte, wobei zwischen den Tieren mit milder und schwerer Hepatitis keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Zusätzlich zur Bestimmung des P450-Gesamtgehalts wurde das Isoenzymmuster der WHV-positiven und der WHV-negativen Tiere charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die Enzymaktivitäten in der mikrosomalen Fraktion mit Hilfe einiger Modellssubstrate, wie Cumarin-7-hydroxylase, Ethoxycumarin O-deethylase und Ethoxyresorufin O-deethylase sowie das Profil der Testosteronhydroxylierung charakterisiert (Kap.3.6.3)

Parameter	WHV-freien	WHV-positive Waldmurmeltiere mit	
	Waldmurmeltiere	milde Hepatitis	schwerer Hepatitis
Cytochrom P450-Gehalt ¹	408 ± 168	392 ± 81	207 ± 26
7-Ethoxyresorufin-O-deethylase ²	699 ± 310	402 ± 115	173 ± 56
7-Ethoxycumarin-O-deethylase ³	3398 ± 1234	2117 ± 849	423 ± 83
Cumarin-7-hydroxylase ³	101 ± 57	105 ± 49	52 ± 34
Glutathion-S-transferasen ⁴	264 ± 49	227 ± 61	239 ± 44

Tab. 4.12: P-450 Gesamtgehalt, Cytochrom P450 abhängige Enzymaktivitäten in Mikrosomen sowie cytosolische Glutathion S-Transferase Aktivität von WHV-positiven und WHV-freien Waldmurmeltiere.

1 Cytochrom P-450 Gesamtgehalt in pmol/ mg mikrosomales Protein

2= Enzymaktivität in pmol Resorufin/mg Protein x min

3= Enzymaktivität in pmol 7-Hydroxycumarin /mg Protein x min

4= Aktivität cytosolischer Glutathion S-transferasen [nmol CDNB/mg x min]

Bei der Bestimmung von ECOD und EROD wurde eine deutliche Aktivitätsabnahme bei den Virus-infizierten Tieren festgestellt (Tab.4.12). Obwohl hier wegen der begrenzten Verfügbarkeit der Leberproben die detaillierte Darstellung der Enzymaktivitäten

einzelner Tiere nach dem Grad der Hepatitis unmöglich war, wurde z. B. bei den Tieren mit starker Hepatitis eine eindeutige Aktivitätsminderung gegenüber den Tieren mit milder Hepatitis erkennbar.

4.2.2.2 Testosteron-Metabolismus in Lebermikrosomen der Waldmurmeltiere

Der Gesamtumsatz von Testosteron in Mikrosomen der WHV-freien Tiere lag bei 2154 pmol/mg Protein x min. der von WHV-positiven Tieren betrug 1738 pmol/mg Protein x min was eine abnahme der Hydroxylierungskapazität auf etwa 80% entspricht.

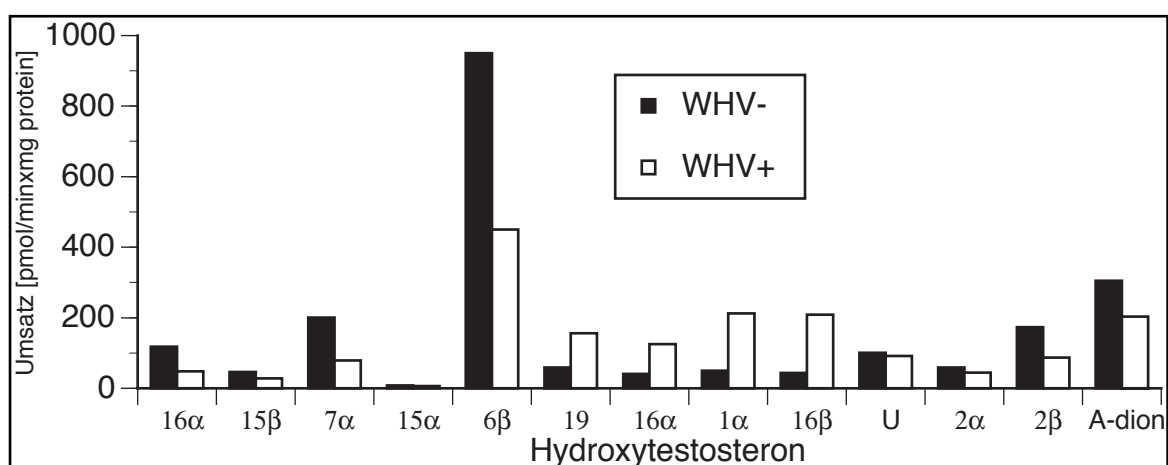


Abb. 4.10: Cytochrom P450-abhängiger Testosteronhydroxylierung in Mikrosomen aus WHV-positiven und WHV-freien Waldmurmeltiere

Angegeben sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen
 WHV- = Virus-freie Kontrolltiere; WHV+ = Virus-infizierte Tiere
 A-dion = 4-Androsten-3,17-dion; U= unbekannte Metabolite
 2β- und 11β-OHT konnten nicht voneinander getrennt werden.

Hauptmetabolit sowohl bei WHV-freien als auch bei WHV-positiven Tieren war 6β-OHT mit einem Anteil von 44% bzw. 26% an der Gesamthydroxylierung. An zweiter Stelle folgte bei WHV-freien Tieren 4-Androsten-3,17-dion mit 14%, während bei den Virusträgern neben Androstendion 16β-OHT und 1α-OHT in etwa vergleichbarer Menge (12%) gebildet wurden. Auffällig war die Umsatzminderung von 6β-OHT bei Virusträger auf 26%. Darüber hinaus wurden bei WHV-infizierten Tieren nicht nur das 16α-OHT und 16β-OHT sondern auch Metabolite, wie 19-OHT und 1α-OHT in erhöhter Menge gebildet, die bei der Ratte nur in untergeordneten Menge entstehen.

4.2.2.3 AFB₁-Metabolismus mit Mikrosomen aus Virus-infizierten und Virus-freien Waldmurmeltieren.

Aus tiefgefrorenen Leberstücken von WHV-positiven Waldmurmeltieren, bei denen durch Infektion mit WHV (engl. Woodchuck Hepatitis Virus) eine chronische aktive Hepatitis experimentell ausgelöst worden war, und aus entsprechenden WHV-freien Kontrolltieren wurden subzelluläre Leberfraktionen gewonnen und zum Studium der Interaktion zwischen AFB₁ und HBV auf der Ebene der Biotransformation eingesetzt.

Die detaillierte serologische und histologische Charakterisierung von WHV-infizierten und WHV-freien Waldmurmeltieren, wie z. B. virologische Marker im Serum oder der Grad der Hepatitis, wurde im Labor von Prof. Dr. P. Bannasch, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, durchgeführt. Auch das WHsAg (Woodchuck Hepatitis Surface Antigen) und die WHV-DNS im Serum von WHV-positiven Tieren während den früheren Phasen der Infektion und das Auftreten von Anti-WHs-Antikörper während den späteren Infektionsphasen wurden in gleichen Labor analysiert. Diese und andere detaillierte Darstellungen der histologischen und serologischen Analyse der WHV-infizierten und WHV-freien Waldmurmeltieren sind bereits publiziert (Bannasch et al., 1995).

Die Einteilung der Stadien der chronisch aktiven Hepatitis als mild, stark und sehr stark basierte auf dem Ausmaß der periportalen Zelluntergänge, periportalen Fibrose und Lymphozyteninfiltration. Nicht infizierte Kontrolltiere zeigen dagegen normale Leberhistologie.

Untersucht wurden subzelluläre Leberfraktionen aus zehn WHV-positiven und acht WHV-freien Tieren. Nach der Inkubation von [³H]AFB₁ mit Lebermikrosomen von Waldmurmeltieren in Anwesenheit von Lebercytosol aus C57BL/6 Mäusen und mit GSH-Zusatz wurden die Metabolite extrahiert über RP-HPLC chromatographisch getrennt und radioametrisch quantifiziert.

Wie die Inkubationsstudien mit AFB₁ [128 µM] unter Einsatz von 2 mg mikrosomalen Protein und 3 mg Mauscytosol pro ml sowie NADPH-regenerierendem System und GSH zeigten, wurde eine Linearität der Metabolitenbildung bis zu 15 Minuten festgestellt.

Abbildung 4.11 zeigt die Radioaktivitätsprofil fraktionierter Trennungen von einer Inkubation von [G-3H]AFB₁ mit Lebermikrosomen der Waldmurmeltiere und in Abbildung 4.12 ist das entsprechende UV-Chromatogramm dargestellt.

Wie zu erkennen entsteht AFB₁-8,9-Epoxid als Hauptmetabolit. Als weitere wichtige Metabolite wurden AFQ₁ und AFP₁ sowie AFM₁ identifiziert. Im Gegensatz zu Ratten wurde AFM₁ bei Waldmurmeltieren nur in geringeren Menge gebildet.

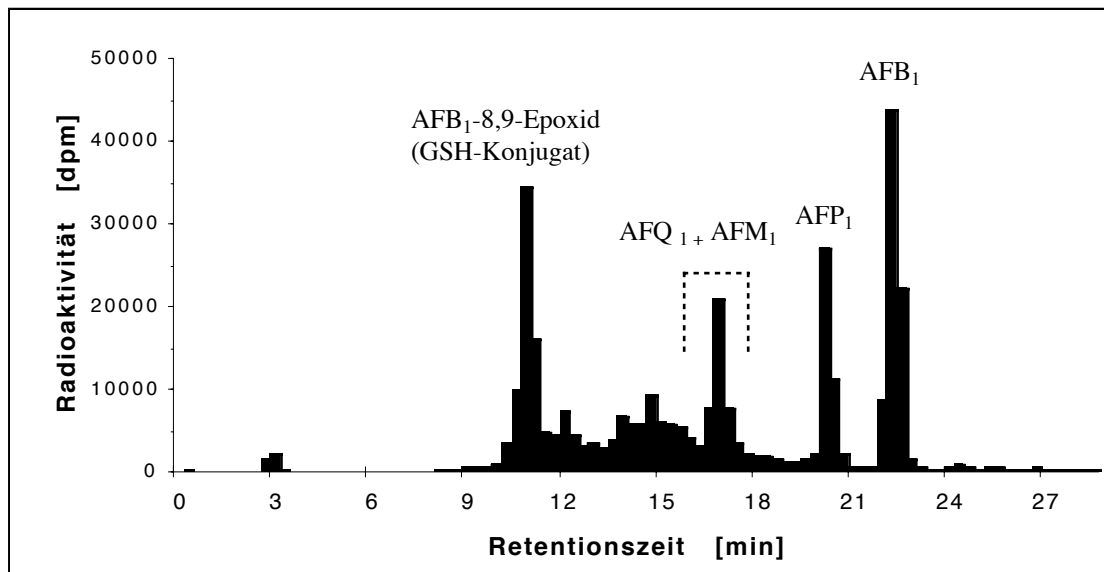


Abb. 4.11: Radiochromatogramm nach Inkubation von [G-³H] mit Lebermikrosomen aus Waldmurmeltiere in Anwesenheit von Mauscytosol (C57BL/6J).

AFQ₁ und AFM₁ konnten in Fraktionen (jeweils 18 Sekunden) nicht voneinander getrennt werden. Die Quantifizierung erfolgte in bezug auf die im UV-Chromatogramm erhaltenen Peakfläche der einzelnen Metabolite.

Abb. 4.13 zeigt den Verlauf der Metabolisierung von AFB₁ in Mikrosomen Virusinfizierter Waldmurmeltiere. Wie zu erkennen ist, verläuft die Metabolisierung in den Mikrosomen infizierter Tiere wesentlich langsamer als in den Virus-freien Kontrolltiere. In den Virusträgern verminderte sich die durchschnittliche Bildung von AFB₁-8,9-Epoxid auf etwa 55%, die von AFQ₁ um 50% und die von AFP₁ um etwa 40% des Wertes von Kontrolltieren, während die Bildungsrate von AFM₁ in beiden Versuchsgruppen vergleichbar war. Die verminderte Bildung von sowohl aktivierten als auch detoxifizierten Metaboliten von AFB₁ bei den WHV-positiven Tieren war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Grund hierfür liegt in der großen interindividuellen Variabilität, wobei die Streuung der WHV-positiven Tiere untereinander am größten war.

Um Aussagen über den Metabolismus von AFB₁ unter nicht-sättigenden Substratkonzentrationen zu machen, wurde eine Inkubation von AFB₁ mit Mikrosomen der Waldmurmeltiere bei einer Endkonzentration von 16 μM untersucht. Das Metabolitenprofil unter diesen Inkubationsbedingungen unterschied sich kaum von der bei enzymsättigender Substratkonzentration, jedoch waren die Mengen des gebildeten 8,9-Epoxids und der detoxifizierten Metabolite um das 10-fache niedriger als in den Ansätzen mit hohen Substratkonzentrationen. Trotz dieser Unterschiede bildeten die WHV-positiven Tiere signifikant niedrigere Metabolitenmengen im Vergleich zu WHV-freien Tieren.

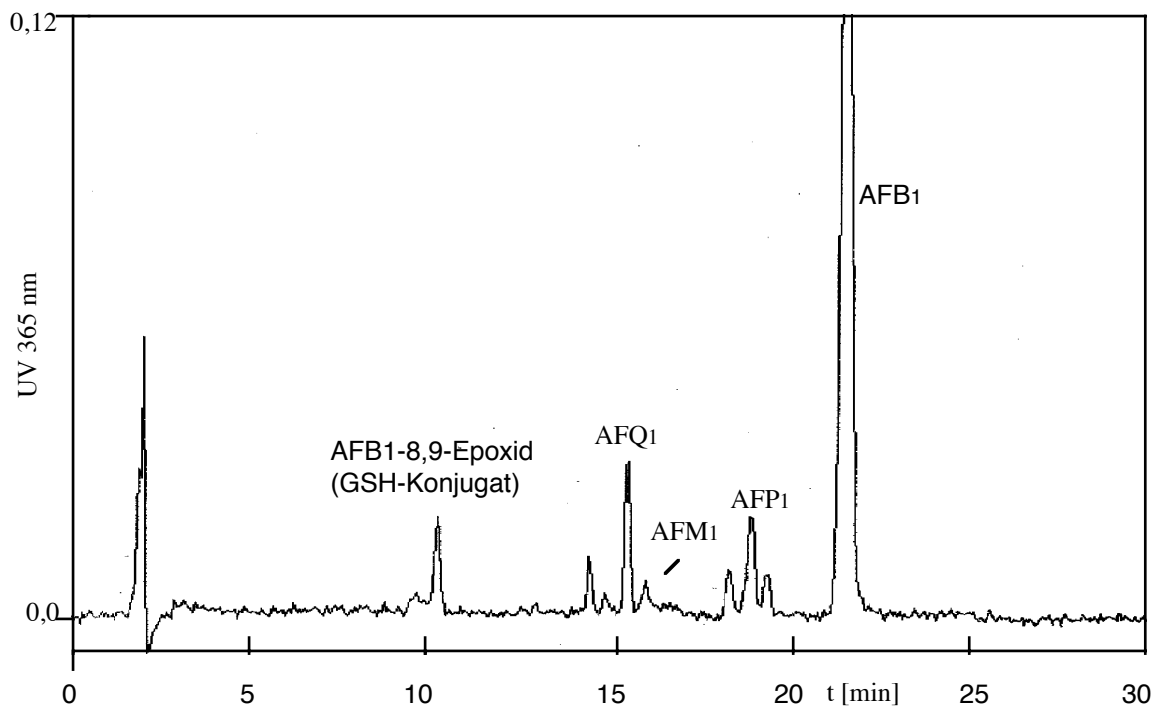


Abb.4.12 Typische UV-Chromatogramme der Extrakte aus Inkubation von Mikrosomen einer der WHV-positiven Waldmurmeltiere mit AFB₁ [128 µM]

HPLC-Bedingungen: Spherisorb RP-18 (5µm), 4x250 mm; Mobile Phase: A: Methanol: Tetrahydrofuran, 93:7,v/v ; B: Ammoniumacetat (20 mM, pH 3,5) Gradientelution von 10 % A in 2 min auf 24 %, in 10 min auf 38%, in 25 min auf 55% und in 35 min auf 100 %. Flußrate 0,8 ml/min

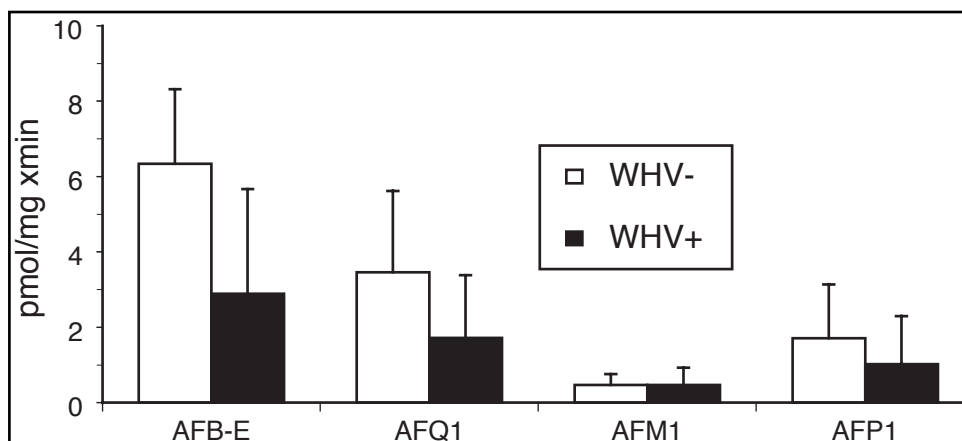


Abb.4.13: Bildung der AFB₁- Metabolite nach Inkubation von AFB₁ 128 µM] mit Mikrosomen von WHV-positiven (WHV+) und WHV-freien (WHV-) Waldmurmeltieren.

Tabelle 4.13 zeigt den Vergleich von einzelnen Proben der Virus-negativen und Virus-infizierten Waldmurmeltiere hinsichtlich der Bildung von aktivem Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid unter Berücksichtigung des Ausmaßes der Lebererkrankung.

Virus-freie Waldmurmeltiere			Virus-infizierte Waldmurmeltiere					
Kennnummer	Grad der ¹ Hepatitis	AFB ₁ -8,9-Epoxid (pmol/min x mg)	Kennnummer	Grad der ¹ Hepatitis	DNA im ¹ Serum ²	HCA ¹	HCC ¹	AFB ₁ -8,9-Epoxid (pmol/min x mg)
F1293/20	–	537	M1082/26	+	–	–	–	649
M1001/20	–	472	M1242/25	+	–	–	–	240
M1212/25	–	197	M1071/20	+	+++	–	–	123
F1006/25	–	608	M1074/20	++	+	–	–	401
F1192/25	–	349	F1122/25	++	++	–	–	60
M1002/25	–	274	M1072/26	++	++	+	–	192
M1191/25	–	413	F1076/25	+++	++	+	+	48
M1291/25	–	528	F1172/25	+++	++	+	+	57
			F1043/25	+++	++	+	+	60
			M1272/20	+++	++	–	–	9
M ± SD		423 ± 132	M ± SD		193 ± 185			

Tab. 4.13: Aktivierungsraten von AFB₁ zum AFB₁-8,9-Epoxid in einzelnen Proben der Virus-freien und Virus-infizierten Waldmurmeltieren unter Berücksichtigung des Ausmaßes der Lebererkrankungen.

¹ Daten wurden aus der Arbeit von Bannasch et. al entnommen (1995); AFB₁-8,9-Epoxid wurde als AFB₁-GSH-Konj. abgefangen

HCA = hepatozelluläres Adenom; HCC = hepatozelluläres Karzinom ; ² = + entspricht $\leq 10^5$, ++ 10^6-7 und +++ 10^8-9 Genomen.

Jedes Tier wurde wie folgt gekennzeichnet z.B. Tier F1293/20: der erste Buchstabe stellt das Geschlecht dar (F=female/weiblich oder M= male/männlich), dann eine vierstellige Kennnummer und die letzten zwei Ziffern nach dem Schrägstrich deuten auf die Beobachtungsdauer in Monaten von der Einteilung bis zur Tötung der Tiere. Die Einteilung der chronisch aktiven Hepatitis in mild (+), stark(++) und sehr stark (+++) basierte auf das Ausmaß der periportalen Zelluntergängen, periportalen Fibrose und Lymphozyteninfiltration, während die nicht infizierten Kontrolltieren (–) eine normale Leberhistologie aufwiesen.

Beim Vergleich der Bildungsrate von AFB₁-8,9-Epoxid in den Mikrosomen WHV-positiver Tieren zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Stadien der Hepatitis und der Aktivierungsrate des Mykotoxins. Es fällt auf, daß bei den Tieren mit stark ausgeprägter aktiver Hepatitis eine extrem verminderte AFB₁-8,9-Epoxid Bildungsrate festgestellt werden kann, während Tiere mit milder Hepatitis relativ mehr Epoxid bilden.

4.3 Einfluß von TGF-β₁ auf die Expression von CYP2A5 in kultivierten Hepatozyten der Maus

4.3.1 Kultivierung von Hepatozyten der Maus

Versuche zur Isolierung vitaler Hepatozyten der Maus mittels Zweistufenperfusion der Leber in situ mit EGTA/Collagenase zeigten, daß im Gegensatz zur Ratte die Technik der Zellisolierung bei der Maus nicht nur umfangreichere Modifizierungen der Perfusionsparameter erfordert, sondern auch daß Hepatozyten der Maus sehr viel empfindlicher auf mechanische und chemische Einflüsse bei der Aufarbeitung reagieren. So wurden in mehreren Vorversuchen sehr unterschiedliche und niedrige Zellausbeuten von Hepatozyten erzielt. Außerdem wiesen die isolierten Hepatozyten, wie die Anfärbung mit Trypanblau zeigte, eine geringere Vitalität, meistens unter 50%, auf. Darüber hinaus waren die in 10% FCS-haltigem Medium ausgesäten Hepatozyten der Maus nicht in der Lage, innerhalb von 2–4 Stunden anzuheften, was schließlich zum Absterben der Zellen führte.

Zur Optimierung der Gesamtprozedur (Kap. 3.8.1) gehörte unter anderem die Auswahl des geeigneten Collagenasetyps und der Collagenasecharge (SERVA Collagenase Hep Plus Cat. Nr. 17447) sowie der Collagenasekonzentration im Perfusionsmedium (0,01% w/v). Außerdem wurde die Perfusion mit Collagenase auf 5 Minuten verkürzt. Dadurch wurde eine durchschnittliche Zellausbeute von 40 x 10⁶ Zellen/Leber und eine Vitalität von 70% erreicht. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit der ausgesäten Hepatozyten, am Boden der Kulturgefäße zu haften, als zuzätzliches Kriterium herangezogen, um weitere Untersuchungen zum Einfluß von TGF-β₁ auf die Expression von CYP2A5 durchzuführen.

4.3.2 Einfluß von TGF-β₁ auf die Vitalität der Hepatozytenkultur

Aufgrund der in den letzten Jahren in vitro und in vivo nachgewiesene apoptotische Wirkung von TGF-β₁, wurde zunächst die Auswirkung von TGF-β₁ in verschiedenen Konzentrationen auf die Vitalität kultivierter Hepatozyten untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.14 dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil der lebenden Hepatozyten bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml um 97%, bei 0,5

ng/ml um 85% lag und bereits bei 2 ng/ml fast die Hälfte der ausgesäten Zellen der abgestorben war.

4.3.3 Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5 in kultivierten Hepatozyten der Maus

Hepatozyten der Maus wurden als Monokultur auf nicht-beschichteten Petrischalen kultiviert, Die Behandlung erfolgte wie in Kap.3.8.2 beschrieben, mit TGF- β und/oder Phenobarbital. Nach 24-72 Stunden Kulturdauer wurden die Hepatozyten vom Plattenboden abgeschabt und nach Zerstörung der Zellen durch Ultraschall und anschließender Zentrifugation bei 10 000 g x 10 min bei 4 °C die postmitochondrialen Fraktion (S-9) gewonnen. Die Aktivität von CYP2A5 wurde durch die 7-Hydroxylierung des Cumarins bestimmt.

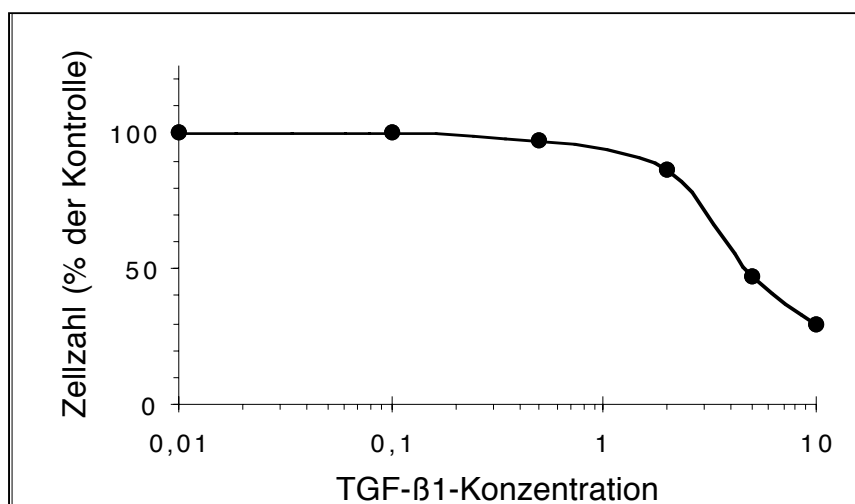


Abb. 4.14: Einfluß der TGF- β_1 -Konzentration auf die Vitalität von kultivierten Hepatozyten der Maus.

Maus Hepatozyten wurden für 4 Stunden in 10% FCS haltigem Medium kultiviert und anschließend in serumfreiem Medium mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β_1 inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde die Vitalität der Zellen mit dem Trypan-Blau-Ausschluß-Tests bestimmt. Der dargestellte prozentuale Anteil der überlebenden Zellen wurde jeweils auf die Zellzahl der nicht mit TGF- β_1 -behandelten kontrollkulturen bezogen. logarithmisch

Da die Cumarin-7-hydroxylase-Aktivität in den verschiedenen Isolierungen erheblich variierte, wurde die relative Aktivität auf die jeweiligen 24 Stunden Kontrollwerte bezogen. Die basale Cumarin-7-hydroxylase-Aktivität betrug 3 pmol/min x mg und nach Kultivierung für 24 Stunden stieg die Aktivität auf 8 pmol/min x mg. Der Abfall der Enzymaktivität unmittelbar nach der Zellisolierung könnte auf die proteolytische Restaktivität der zur Desintegration der Leber verwendeten Collagenase beruhen. Um erste Aussagen über die Induzierbarkeit kultivierter Hepatozyten machen zu können, wurde die CYP2A5 Isoenzym-spezifische COH-Aktivität nach Behandlung mit PB bestimmt. Auf der lichtmikroskopischen Ebene, zeigten PB-behandelte Hepatozyten im

Vergleich zu nicht behandelten Hepatozyten, besonders nach 48 und 72 Stunden Inkubationszeit, ein deutlich besseres Erscheinungsbild mit besserer Haftung am Boden der Petrischalen, kompakter Anordnung und Zell-Zell Kontakte (Abb. 4.18 -C).

Die Behandlung der kultivierten Hepatozyten mit Phenobarbital führte nach 24 Stunden zu einem 2-fachen Anstieg der Aktivität der Cumarin-7-hydroxylase. Nach 48 und 72 Stunden erreichte sie zum Beispiel bei 0,25 ng/ml TGF- β_1 Behandlungsschema ein Maximum, welches gegenüber den Kontrollwerten jeweils 30-fach höher lag.

Um den Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5 zu bestimmen wurden die Hepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β_1 (0,1, 0,25 und 0,5 ng/ml) über einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt. Außerdem wurde die Wirkung von TGF- β_1 auf den Induktionseffekt von PB (2 mM) untersucht. Dabei wurde die Behandlung der kultivierten Hepatozyten mit TGF- β_1 allein oder zusammen mit PB (2 mM) vorgenommen. Abb. 4.15 stellt den Verlauf der Enzymaktivität nach TGF- β_1 Zugabe mit oder ohne gleichzeitiger Behandlung mit PB dar. Die Ergebnisse zeigen, daß in Kultur genommene Maushepatozyten die durch PB induzierte CYP2A5 Aktivität in Abwesenheit von TGF- β_1 über einen Zeitraum bis zu 72 Stunden Kulturdauer aufrechterhalten konnten. Bei einer TGF- β_1 -Konzentration von 0,5 ng/ml kam es zu einer signifikanten Hemmung sowohl der basalen und der PB-induzierbaren COH-Aktivität, während die Behandlung mit 0,25 ng/ml TGF- β_1 nur die PB-induzierbare Enzymaktivität unterdrückte. Mit 0,1 ng TGF- β_1 /ml ließ sich eine leicht erhöhte Enzymaktivität feststellen. Wurden die Hepatozyten sowohl mit 0,1 ng TGF- β_1 /ml als auch mit PB behandelt, so verstärkte sich nach 24 und 48 h die Induktion der COH-Aktivität.

4.3.4 Western Blot Analyse des CYP2A5-Isoenzym

Neben den oben beschriebenen Untersuchungen zur COH-Enzymaktivität wurde auch die Expression des CYP2A5-Isoenzym in kultivierten Maushepatozyten auf Proteinebene untersucht (siehe 3.8.3). Diese Methode ermöglicht es, mit Hilfe monoklonaler Antikörper das CYP2A5-Isoenzym semiquantitativ nachzuweisen. Dazu wurden je 10 μ g der zellulären Proteine mit Hilfe eines 10%-igen Trenngels elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die Proteine aus der SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert worden waren, wurden die Membrane mit einem monoklonalen Antikörper gegen Maus CYP2A5 inkubiert. Zur Färbung der entsprechenden Banden wurde ein mit alkalischer Phosphatase-konjugierter zweiter Antikörper eingesetzt (Kap. 3.8.3.2). Die Ergebnisse einer typischen Western-Blots sind in Abb. 4.16 gezeigt.

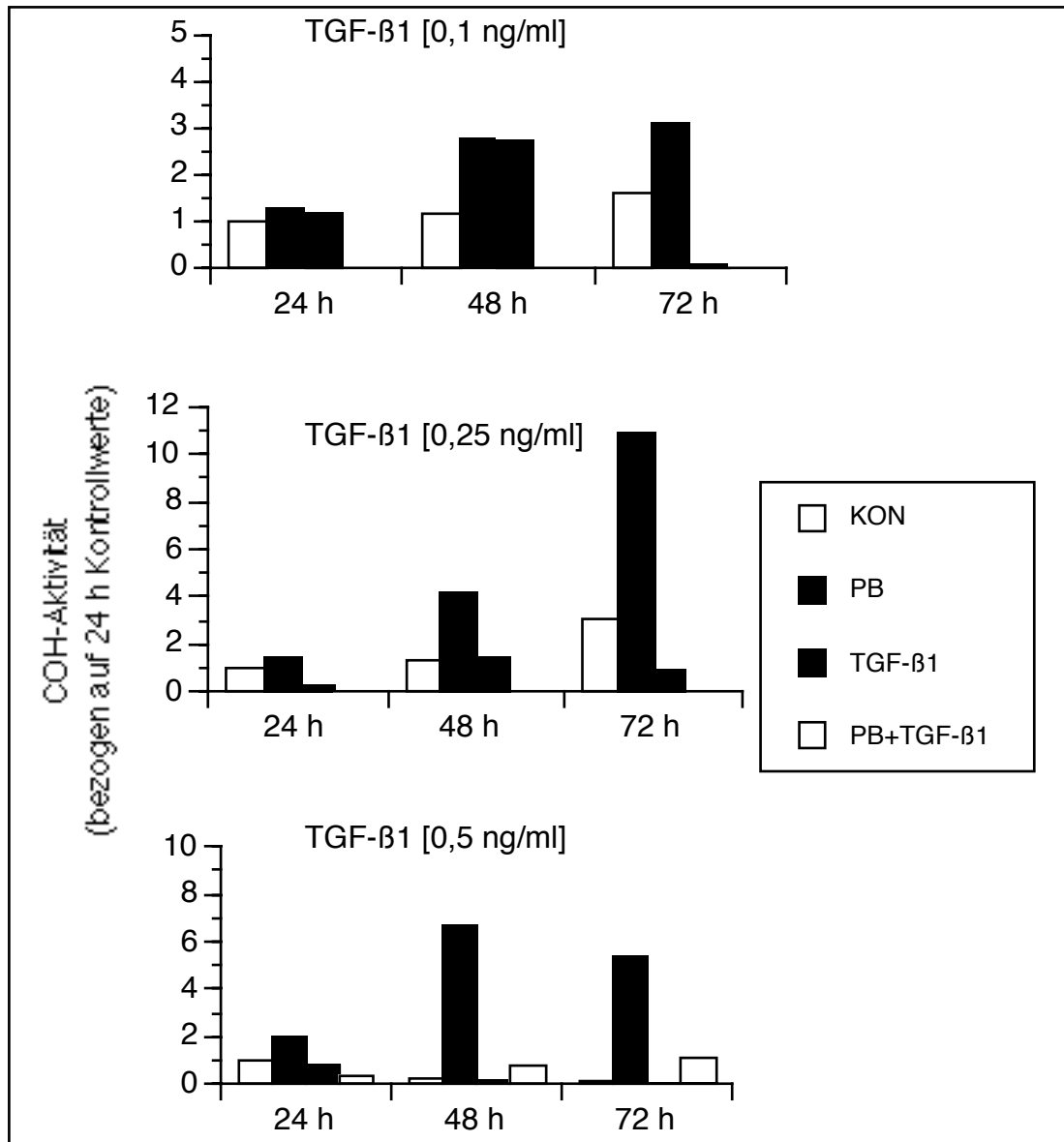


Abb.4.15 Einfluß von TGF-β₁ auf die konstitutive und induzierte Cumarin-7-hydroxylase-Aktivität in kultivierten Maushepatozyten in Abhängigkeit der Kulturdauer

Es wird deutlich, daß nur eine Hauptbande d. h. CYP2A5 im Molekulargewichtsbereich von 50 kDa detektiert wurde. Wie Abb. 4.16 deutlich zeigt, ist die Intensität der Banden der Proteinfraktion aus PB-induzierten Hepatozyten stärker als die aus nicht-induzierten Hepatocyten. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Ergebnissen der COH-Enzymaktivität überein. Darüber hinaus wurde nur in Anwesenheit von 0,1 ng TGF-β₁/ml (bis zu 48 h) eine leichte Induktion festgestellt. Setzt man Maushepatozytenkulturen TGF-β₁ in einer Konzentration von 0,25 ng/ml zu, so hat dies keinen Einfluß auf die

Expression von CYP2A5. Bei TGF- β_1 -Konzentrationen im Bereich von 0,50 ng/ml zeigt sich keine bzw. eine eher hemmende Wirkung auf die Expression von CYP2A5.

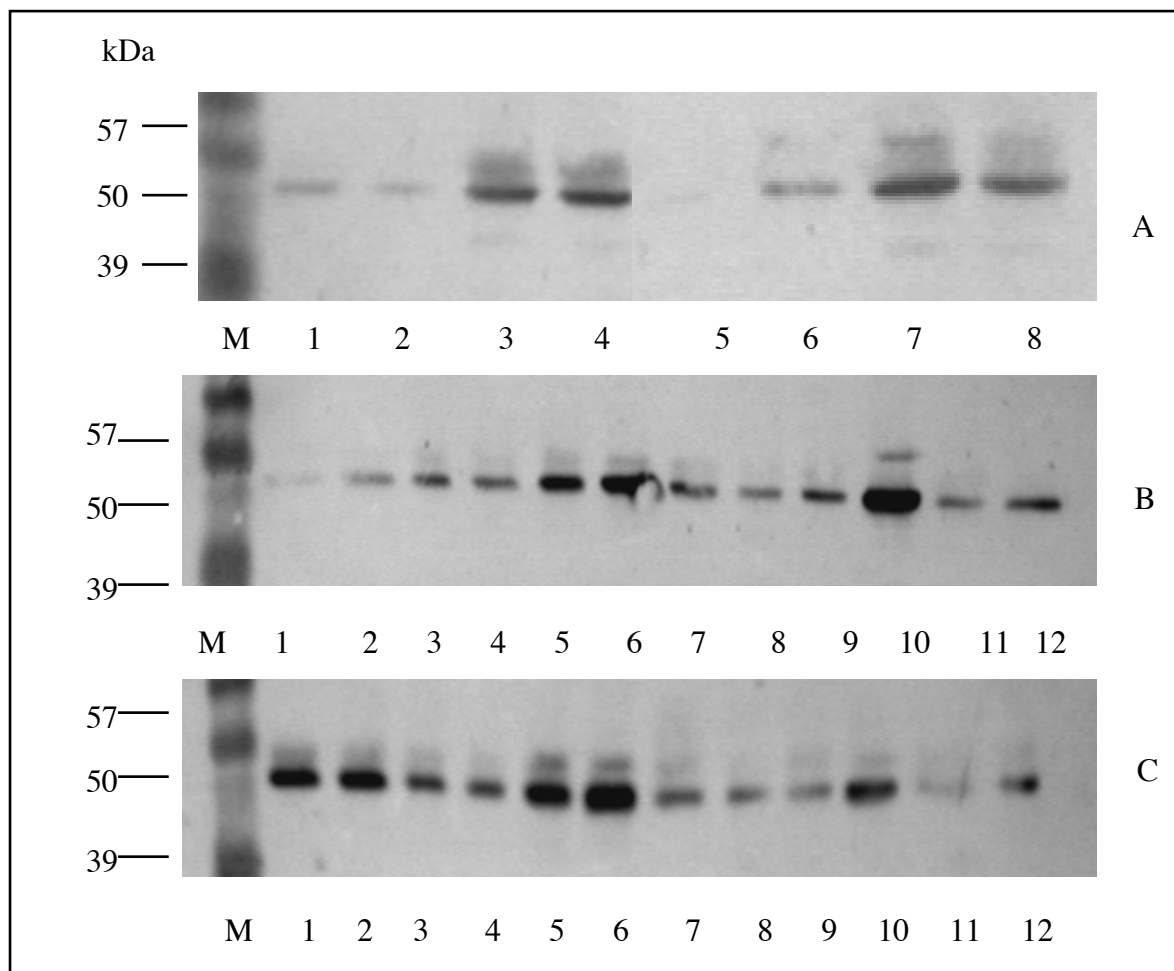


Abb. 4.16: Western Blot Analyse des CYP2A5-Isoenzym in postmitochondrialen Fraktionen von Maushepatozytenkulturen.

Dargestellt sind die Western-Bot-Analysen nach Behandlung mit TGF- β_1

(A) TGF- β_1 [0,1 ng/ml] Spuren 1-8 : (M) Molekulargewichtsmarker; (1) Kon 24 h; (2) PB 24 h; (3) PB+TGF- β_1 24h ; (4) TGF- β_1 24h (5) Kon 48 h; (6) PB 48 h; (7) PB+TGF- β_1 48h (8) TGF- β_1 48 h

(B) TGF- β_1 [0,25 ng/ml] Spuren 1-12 (1) Kon 24 h; (2) PB 24 h; (3) PB+TGF- β_1 24h ; (4) TGF- β_1 24h; (5) Kon 48 h; (6) PB 48 h; (7) PB+TGF- β_1 48h; (8) TGF- β_1 48 h; (9) Kon 72 h; (10) PB 72 h; (11) PB+TGF- β_1 72h; (12) TGF- β_1 72 h

(C) TGF- β_1 [0,5 ng/ml] Spuren 1-12 (1) Kon 24 h; (2) PB 24 h; (3) PB+TGF- β_1 24h ; (4) TGF- β_1 24h; (5) Kon 48 h; (6) PB 48 h; (7) PB+TGF- β_1 48h; (8) TGF- β_1 48 h; (9) Kon 72 h; (10) PB 72 h; (11) PB+TGF- β_1 72h; (12) TGF- β_1 72 h

4.3.5 Morphologische und DNA-Fragmentierungsstudien zum Nachweis der Apoptose

Um eine mögliche apoptotische Wirkung von TGF- β_1 nachzuweisen, wurden die mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β_1 behandelten Hepatozyten unter morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten untersucht.

Die morphologischen Untersuchungen der apoptotischen Zellen basierte auf der selektive Anfärbung der Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff Hoechst 3328 (Kap. 3.8.4). Die darauffolgende mikroskopische Betrachtung ermöglichte dann die Unterscheidung normaler Hepatozyten von apoptotischer und nekrotischer Zellen. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen besitzen die apoptotischen Zellen eine intakte Zellmembran, charakteristische apoptotische Körperchen und kondensiertes Chromatin. Dabei wurden je Behandlung 1000 Hepatozyten ausgezählt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen angegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4.17 dargestellt und zeigen, daß bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml TGF- β_1 der relative prozentuale Anteil von apoptotischen Zellen erhöht ist.

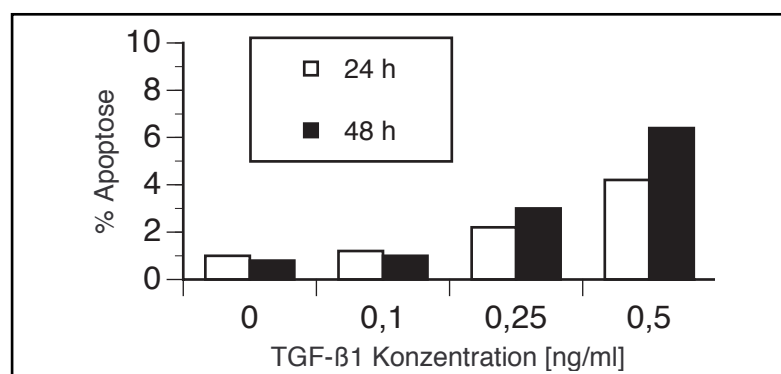


Abb. 4.17: Prozentualer Anteil von apoptotischen Maushepatozyten nach Behandlung mit TGF- β_1

Man erkennt, daß nach 24 Stunden Kulturdauer die Apoptoserate auf etwa 4,2 % und nach 48 h auf 6,6 % ansteigt. Der Hinweis, daß TGF- β_1 bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml zum Anstieg der Apoptose führt, veranlaßte uns auch, den Einfluß einer PB-Behandlung auf die apoptotische Wirkung von 0,5 TGF- β_1 ng/ml zu untersuchen. In Gegenwart von 2 mM PB wurde die Apoptoserate von TGF- β_1 auf 4% nach 24h und auf 4,8% nach 48h herabgesetzt. Eine morphologische Analyse ergab, daß die mit PB-vorbehandelten Hepatozyten eine gute Anheftungsrage, besseres Wachstum sowie Zell-Zell-Kontakte aufwiesen.

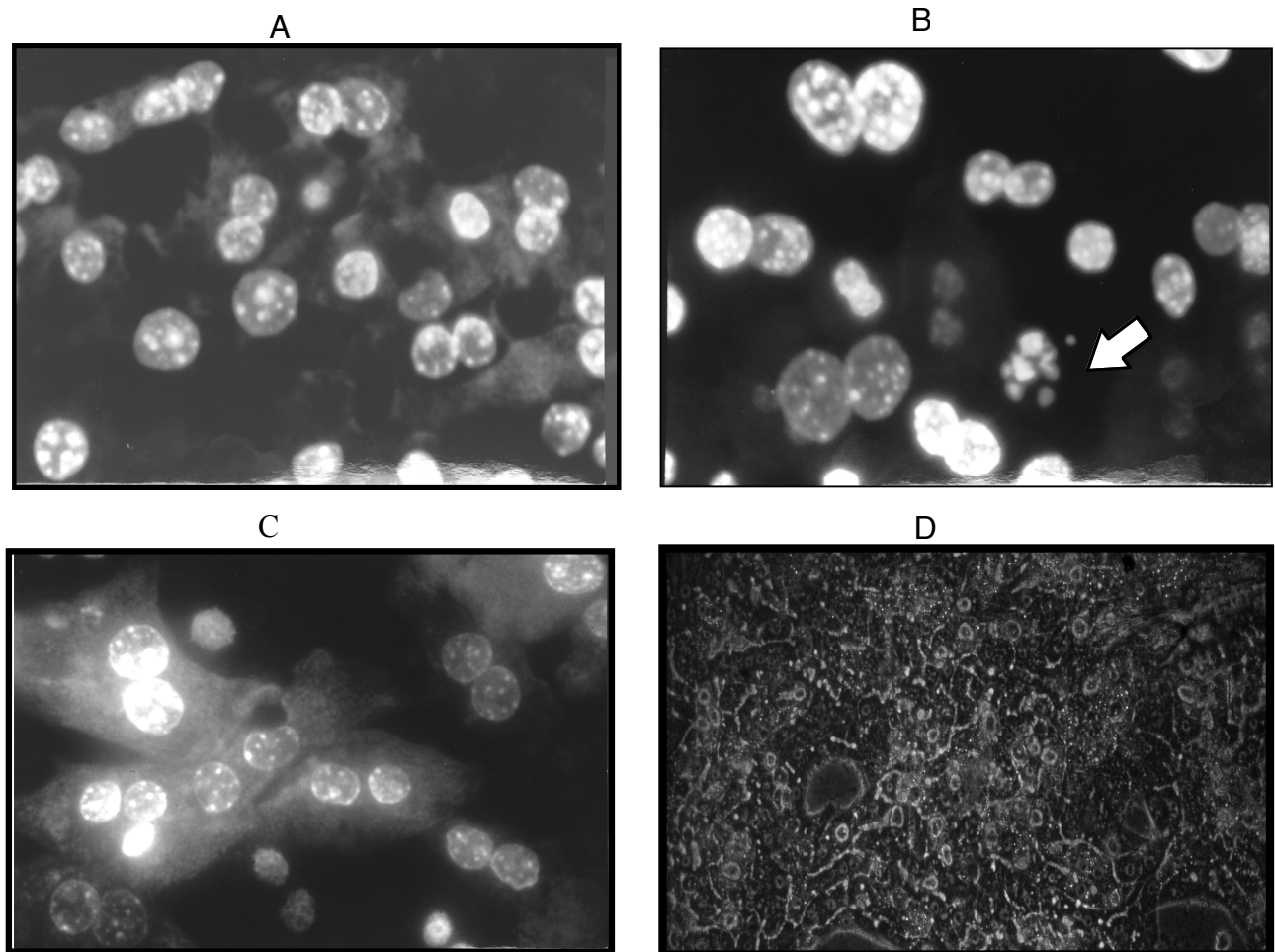


Abb. 4.18: Fluoreszenzmikroskopisch Bilder (a, B, und C) sowie lichtmikroskopisches Bild (D) von kultivierten Maushepatozyten (48 h). Morphologische Untersuchung der Apoptose (A) Kontrollhepatozyten, (B) nach Behandlung mit TGF-β1 (0,5 ng/ml) (C) nach Behandlung mit Phenobarbital (2mM) und (D) Morphologie der unbehandelten Hepatozyten Monokultur. Die Markierung im Bild B zeigt nachgewiesene apoptotische Hepatozyt.

Zusätzlich zu den morphologischen Untersuchungen der kultivierten Hepatozyten wurde, die für die Apoptose charakteristische DNA-Fragmentierung mittels eines Agarose-Gel-Elektrophorese untersucht. Da während der Apoptose die endogene Endonuclease den DNA-Doppelstrang in Mono- und Oligonukleosomen mit einer Länge von ca. 180 bp spaltet, erwartet man nach Extraktion und Trennung der DNA die typische DNA-Leiter im Agarose-Gel. Zu diesem Zweck wurde aus Kontrollhepatozyten und aus den mit TGF-β1 vorbehandelten Hepatozyten die DNA extrahiert und im 2%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Obwohl bei der morphologischen Untersuchung fixierter Hepatozyten bis zu 6% apoptotische Zellen nachgewiesen worden waren, konnte hier keine DNA-Fragmentierung festgestellt werden (Abb. 4.19).

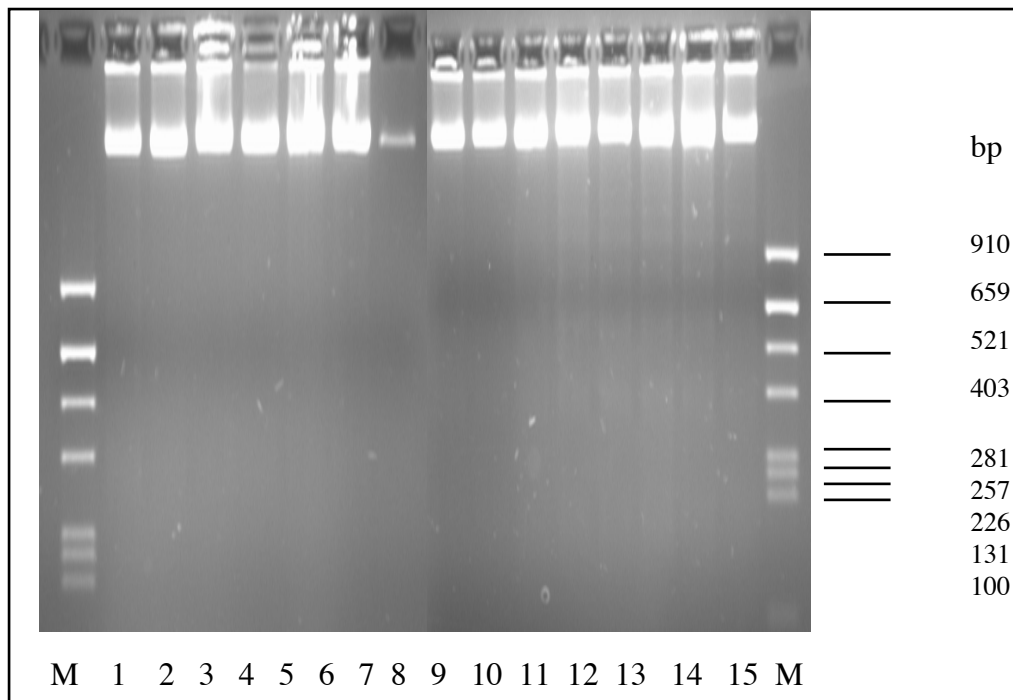


Abb. 4.19 Analyse der DNA-Fragmentierung durch Agarosegel- elektrophorese (2%) nach Extraktion der genomischen DNA aus mit TGF- β_1 behandelten kultivierten Maushepatozyten

In den Spuren 1-15 wurden Proben aus TGF- β_1 Behandlungen aufgetragen:

(die Zahl in eckigen Klammern gibt die Konzentration von TGF- β_1 in den Kulturen an)

(1) Kon 24 h; (2) [0,1] 24 h; (3) [0,25] 24h ; (4) [0,5] 24h; (5) [0,5] +PB 24h;

(6) Kon 48 h; (7) [0,1] 48h; (8) [0,25] 48 h; (9) [0,5] 48h; (10) [0,5]+PB 48 h;

(11) Kon 72 h; (12) [0,1] 72 h; (13) [0,25] 72h; (14) [0,5] 72 h; (15) [0,5]+PB 72

Andererseits wurden Versuche durchgeführt, in denen die DNA sowohl aus nicht adhärennten Zellen als auch aus den angehängtete Hepatozyten extrahiert und im Agarose-Gel aufgetrennt wurde. Wie es in Abb.4.21 dargestellt, erkennt man das typische Muster der DNA-Fragmentierung, die unabhängig von der Konzentration von TGF- β_1 auftritt. Allerdings lag hier der Anteil der in Suspension befindlichen Hepatozyten bei etwa 20%, was darauf hinweist, daß es sich bei diesen Hepatozyten hauptsächlich um tote Zellen handelt.

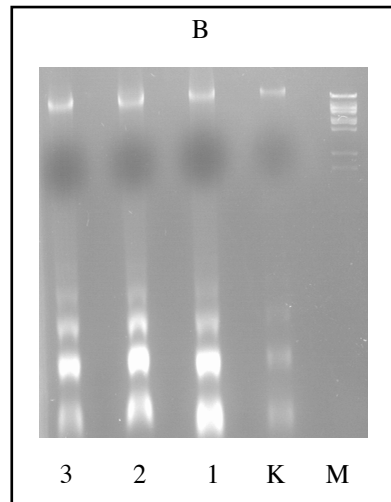


Abb. 4.20 Analyse der DNA-Fragmentierung in Agarosegel Elektrophorese (2%) nach Extraktion der genomischen DNA aus mit TGF- β_1 behandelten kultivierten Maushepatozyten.

In den Spuren 1-3 wurde folgende Proben aufgetragen

(M) Marker (Abb. ; (K) Kontrolle ; TGF- β_1 (1) [0,1ng/ml]; (2) [0,25ng/ml]; (3) [0,5ng/ml]

DNA wurde sowohl aus adherenten als auch aus nichtadherenten Hepatozyten extrahiert.

5 Diskussion

5.1 Verteilung und Induktion von AFB₁-metabolisierenden Enzymen in verschiedenen Leberzelltypen

Das Mykotoxin Aflatoxin B₁ gehört zu den chemischen Kanzerogenen, die erst nach Biotransformation zu reaktiven Metaboliten ihre biologische Wirkung entfalten. Im Falle von AFB₁ entsteht das 8,9-Epoxid, das aufgrund seiner Elektrophilie an kritische Bestandteilen der Zelle, wie die DNA, binden und Mutationen auslösen kann, die bei der Tumorentstehung von Bedeutung sein können.

In vivo und in vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß im Hinblick auf die tumorinduzierende Wirkung von AFB₁ ein Speziesunterschied zwischen Ratte, Maus und Mensch besteht (Hsieh et al., 1977; Wong & Hsieh, 1980; Degen und Neumann 1981). So sind Mäuse resistenter gegenüber der kanzerogenen Wirkung von AFB₁ als Ratten, während der Mensch hinsichtlich der Sensitivität dazwischen liegt. Die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber AFB₁ scheint auf einer unterschiedlichen Ausstattung der Leber mit den detoxifizierenden Glutathion-S-transferasen zu beruhen. Es wurde nämlich festgestellt, daß die Konjugationskapazität der GSTs gegenüber AFB₁-8,9-Epoxid am höchsten im Mauscytosol ist (Beutler et al., 1992). Demzufolge steht weniger AFB₁-8,9-Epoxid für die Bindung an die DNA zur Verfügung, wodurch seine krebsauslösende Potenz herabgesetzt wird.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß AFB₁ bevorzugt Lebertumore hervorruft, hingegen werden Tumore in extrahepatischen Geweben selten beobachtet. Die Leber als wichtigstes Stoffwechselorgan enthält nicht nur insgesamt deutlich mehr Cytochrome P450 als andere Organe, sondern insbesondere die Isoformen, die bei der Generierung vom ultimal kanzerogenen Metabolit des AFB₁, 8,9-Epoxid, eine entscheidende Rolle spielen (Imaoka et al., 1992).

Eine weitere Eigenschaft von AFB₁ ist die ausgeprägte zelltypspezifische hepatokanzerogene Wirkung. Bei Ratten führte eine chronische Behandlung mit AFB₁ zu hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen (Wogan, 1973; IARC, 1976), wobei Parenchym- und Gallengangsepitelzellen als Zielzellen für die krebsauslösende Wirkung von AFB₁ fungieren. Hingegen wurden keine Tumore beobachtet, die von Kupffer- und Endothelzellen ausgehen. Die molekularen Mechanismen für die zelltypspezifische Toxizität von AFB₁ gegenüber Nichtparenchymzellen (NPC) sind weitgehend unbekannt. Daß die Verteilung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymaktivitäten, vor allem Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, in den verschiedenen Leberzellpopulationen nicht homogen ist, wurde schon von anderen Autoren

gezeigt (Lafranconi et al., 1986; Steinberg et al., 1987; Rich & Lodola, 1987). Mutagenitätsstudien mit AFB₁ haben ergeben, daß das Mykotoxin von Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Leber zu mutagenen Metaboliten aktiviert werden kann (Schlemper et al., 1991). Weiterhin wurde gezeigt, daß nach Gabe von Aroclor 1254 an Ratten die durch Leberparenchymzellen vermittelte Aktivierung von AFB₁ zu einem bakteriellen Mutagen stark abnahm, daß aber die durch Lebernichtparenchymzellen vermittelte Aktivierung leicht zunahm (Schlemper et al. 1991). Aroclor 1254 ist eine Mischung verschiedener polychlorierter Biphenyle und vereint die Cytochrom P450-induzierenden Eigenschaften von 3-MC und PB.

Neben der Aktivierungsreaktion von AFB₁ zum 8,9-Epoxid, kann eine Cytochrom P450-abhängige Hydroxylierungsreaktion stattfinden, die AFB₁ zum hydroxylierten Metabolit AFM₁ umwandelt. Diese Umsetzung wird von der Aflatoxin-9a-Hydroxylase katalysiert, ein Cytochrom P450-abhängiges Enzym, dessen Induktion durch 3-MC in der Maus über den "Ah-locus" reguliert wird (Faletto et al., 1988; Koser et al., 1988). Da das Mutagenitätspotential von AFM₁ etwa 5% des AFB₁-Potentials beträgt, kann dieser Biotransformationsweg als Detoxifizierungsprozeß betrachtet werden (Gurtoo et al., 1978). Auf dieser Grundlage wurde untersucht, ob die zelltypspezifische Mutagenität oder Toxizität von AFB₁ auf einer unterschiedlichen Regulation der AFB₁-9a-Hydroxylase beruht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die katalytische Aktivität der AFB₁-9a-Hydroxylase in NPC nachgewiesen. Interessanterweise war die durch dieses Enzym katalysierte AFM₁-Bildungsrate in NPC fast so hoch wie in PC. Schließlich war die AFM₁-Bildungsrate unter niedrigen, umweltrelevanten Konzentrationen von AFB₁ etwas höher in NPC als in PC. Daraus kann man schließen, daß dieser Metabolisierungsweg die NPC vor der toxischen Wirkung von AFB₁ schützt, da es AFB₁ zu einem weitaus weniger mutagenen Metabolit, dem AFM₁, umwandelt und gleichzeitig die für die Epoxidierung zur Verfügung stehenden Menge an AFB₁ vermindert.

Ein bemerkenswerter Befund zur Bedeutung dieses Detoxifizierungswegs von AFB₁ wurde in einer epidemiologischen Studie in China erhoben, in der überschenderweise ein erhöhtes Risiko bei Nichtrauchern an einem Lebertumor zu erkranken im Vergleich zu Rauchern festgestellt wurde (Lin et al., 1991). Die Autoren vermuten, daß die hohen Konzentrationen an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die die Rauchern aufgenommen hatten, zur Induktion der CYP1A-Unterfamilie geführt haben könnten, wodurch eine verstärkte Biotransformation von AFB₁ zum AFM₁ stattfindet.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es nach Induktion durch Aroclor 1254 (ARO), 3-Methylcholanthren (3-MC) und Isosafrol (ISO) zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Aktivität der AFB₁-9a-Hydroxylase Aktivität in Mikrosomen der beiden Leberzellpopulationen kommt. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit

früheren Arbeiten, die ebenfalls in Rattenlebermikrosomen die durch die CYP1A-Unterfamilie katalysierte Umwandlung von AFB₁ zu AFM₁ festgestellt hatten (Yoshizawa et al 1982; Shimada et al., 1987; Stresser et al., 1994).

Im Hinblick auf die Induktionspotenz war die AFM₁-Bildung in PC am stärksten nach der Behandlung mit ARO, gefolgt von 3-MC und ISO; dagegen wurde in NPC die umgekehrte Reihenfolge beobachtet. Die Beobachtung, daß nach Induktion mit ARO, 3-MC und ISO die Aktivität der AFB₁-9a-Hydroxylase ansteigt, deutet auf die Beteiligung des Ah-Rezeptors an der Induktion hin. Denn von den drei Substanzen ist bekannt, daß sie die Induktion der hepatischen CYP1A1 und 1A2 über den Ah-Rezeptor vermitteln. Man kann also annehmen, daß die Aktivität der AFB₁-9a-Hydroxylase sowohl in PC als auch in NPC der Rattenleber, ähnlich wie in der Maus, über den Ah-Rezeptor reguliert wird. Koser et al. (1988) konnten in der Maus die durch CYP1A2 katalysierte Bildung von AFM₁ nachweisen, die der Ah-Rezeptor Regulation unterliegt.

Die molekularen Mechanismen dieser Induktion wurden in der Maus weitgehend geklärt: die Enzyminduktoren führen vor allem zur Aktivierung der Gentranskription und damit verbunden zur erhöhten Biosynthese unterschiedlicher CYP-Isoenzymen (Nebert & Gonzalez, 1987).

Außerdem wurde in PC-Mikrosomen nach Behandlung mit PB eine bis zu 2,6-fach erhöhte AFM₁-Bildung ermittelt, während diese in NPC unbeeinflusst blieb. In dieser Hinsicht haben Faletto & Gurtoo (1989) berichtet, daß nach Behandlung mit PB nur eine geringe, statistisch nicht signifikante Aktivitätssteigerung festzustellen war. Möglicherweise ist dies dadurch bedingt, daß PB durch die zusätzliche Induktion von CYP3A2 und CYP2A1 eine mäßige Erhöhung der AFM₁-Bildung hervorruft. Diese Cytochrom P-450-Isoenzyme sind ebenfalls durch 3-MC induzierbar und vom 3-MC ist wiederum bekannt, daß es zu einer vermehrten Bildung von AFM₁ führt.

AFQ₁ zeigt, wie AFM₁, ein 50-fach niedrigeres Mutagenitätspotential im Vergleich zu AFB₁ (Gurtoo et al., 1978). Deshalb wird dessen Bildung als Detoxifizierungsprozeß betrachtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die Bildungsrate von AFQ₁ sowohl in PC als auch in NPC nach PB- und ISO-Vorbehandlung eindeutig erhöht war, wobei dessen Bildung in NPC nach ISO am größten war. Dagegen blieb die Umsatzrate nach 3-MC und ARO unverändert. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit den Resultaten von Metcalfe et al. (1981), die zeigt, daß die 3 α -Hydroxylierung von AFB₁ durch CYP2B1/2B4 und CYP1A2 katalysiert wird.

AFP₁, das enzymatisch durch O-Demethylierung von AFB₁ gebildet wird, weist eine 50-fach niedrigere Mutagenität als AFB₁ auf. Weder bei Inkubation mit induzierten noch mit nicht-induzierten PC- und NPC-Mikrosomen konnte AFP₁ nachgewiesen werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden von andere Autoren gemacht (Wong & Hsieh, 1980; Ramsdell & Eaton, 1990; Stresser et al., 1994). Dieser Metabolismusweg scheint also in Ratten eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Bildung von AFB₁-8,9-Epoxid in NPC direkt nachgewiesen werden. Ein quantitativer Vergleich zeigt jedoch, daß die NPC eine geringere Epoxidierungskapazität aufweisen im Vergleich zu PC. Darüber hinaus wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in NPC aus Kontrollmikrosomen mehr immunoreaktives CYP2C11 nachgewiesen; hingegen konnte spektrophotometrisch Cytochrom P450 nur nach Gabe von Enzyminduktoren nachgewiesen werden.

Es wurde auch festgestellt, daß das Ausmaß der Aktivierungsrate von dem eingesetzten Induktor und teilweise vom Zelltyp abhängig war. So war zum Beispiel in PC-Mikrosomen nach Vorbehandlung mit PB, ISO und ARO die Aktivierungsrate von AFB₁ zum 8,9-Epoxid bis zu 3 mal höher als in Kontrollmikrosomen, was auf die Beteiligung von PB-, ISO- und ARO-induzierbaren CYP-Formen an der Aktivierung von AFB₁ schließen läßt. Im Gegensatz dazu hatte die Induktion mit 3-MC in PC-Mikrosomen keinen Einfluß auf die Aktivierung von AFB₁. Demgegenüber zeigten NPC-Mikrosomen aus mit Induktoren behandelten Ratten im Vergleich zu Mikrosomen aus unbehandelten Ratten eine gesteigerte Bildung von AFB₁-8,9-Epoxid. Auffallend war in diesem Zusammenhang die erhöhte Aktivierungsrate von AFB₁ in NPC nach 3-MC Induktion, die in der Literatur nicht beschrieben wird.

In früheren Arbeiten (Lafranconi et al., 1986; Steinberg et al., 1987) wurde gezeigt, daß die NPC im Vergleich zu PC sehr geringe Cytochrom P450-abhängige- Enzymaktivitäten aufweisen. Es wurde daher vermutet, daß die Resistenz der NPC gegenüber AFB₁ in Zusammenhang mit dem niedrigen Cytochrom P450-Gehalt stehen könnte. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse wird ersichtlich, daß die NPC zwar in der Lage sind, AFB₁ zu aktivieren, jedoch im Verhältnis zu den hydroxylierten Metaboliten nur geringe Mengen an AFB₁-8,9-Epoxid generieren.

Die Annahme, daß AFB₁ in einer spezifischen Art und Weise toxisch auf PC wirkt, wird durch eine Beobachtung aus in vivo Untersuchungen an AFB₁-vorbehandelten Ratten untermauert: die Parenchymzellen weisen im Vergleich zu NPC höhere AFB₁-Protein-Addukte auf, was eine verminderte Zytotoxizität des AFB₁ gegenüber NPC zur Folge hat (Jennings et al., 1994).

Zur genauen enzymatischen Charakterisierung des Cytochrom P450-Isoenzymmusters in PC und NPC wurde die Analyse der zellvermittelten regio- und stereoselektiven Hydroxylierung von Testosteron durchgeführt. Hierbei zeigten die beiden Zellpopulationen aus unbehandelten Ratten ein ähnliches Hydroxylierungsmuster.

Nach Induktion wurde jedoch bei den NPC eine eindeutige Aktivitätssteigerung beobachtet, obwohl die Enzyme der NPC-Mikrosomen nur geringfügig hydroxylieren.

Trotz einer überlappenden Regio- und Stereoselektivität der CYP-Isoenzyme, konnte ein gewisser Zusammenhang zwischen den an der Hydroxylierung von Testosteron und am Metabolismus von AFB₁ beteiligten Enzymen festgestellt werden.

Die Tatsache, daß in nicht-induzierten PC-Mikrosomen das AFB₁-8,9-Epoxid als Hauptmetabolit des AFB₁ gebildet wird, und gleichzeitig 2 α -OHT, als einziges Produkt des CYP2C11, Hauptmetabolit des Testosterons ist, deutet darauf hin, daß das konstitutiv exprimierte CYP2C11 maßgeblich an der Aktivierung von AFB₁ beteiligt ist.

In dieser Hinsicht haben Imoaka et al. (1990) in Mikrosomen von männlichen Ratten gezeigt, daß CYP2C11 alleine einen Anteil von 60% des Gesamtgehaltes an spektrophotometrisch meßbarem Cytochrom P450 ausmacht, dessen Hemmung durch Anti-CYP2C11 Antikörper die Mutagenität von AFB₁ bis zu 50% reduziert.

In PC-Mikrosomen von PB-behandelten Ratten entstand durch die CYP2B-Unterfamilie 16 β -OHT als Hauptmetabolit, gefolgt von den Produkten der CYP3A-Unterfamilie 2 β -, 15 β - und 6 β -OHT. Gleichzeitig führte PB zu einer Suppression der CYP2C11-abhängigen Hydroxylierung von Testosteron und demzufolge zu einer verminderten Bildung von 2 α -, 16 α -OHT und 4-Androsten-3,7-dion. Daraus kann geschlossen werden, daß die nach Biotransformation von AFB₁ beobachtete erhöhte Bildung des 8,9-Epoxids auf die Induktion von CYP2B1/2 und CYP3A2 zurückzuführen ist.

Ein indirekter Hinweis, daß neben CYP2C11 auch CYP3A2 an der Aktivierung von AFB₁ in der Ratte beteiligt sein könnte, kam aus Mutagenitätsstudien unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte CYP-Formen. So führte die Inhibierung durch Anti-CYP2C11 und Anti-CYP3A2 zu einem Rückgang der durch AFB₁ vermittelten Mutagenität von jeweils bis zu 50% des Kontrollwertes. Dies weist darauf hin, daß in männlichen Ratten CYP2C11 und CYP3A2 die zwei wichtigsten Cytochrom P450-Isoenzyme für die Aktivierung von AFB₁ sind (Imoaka et al., 1992).

Die statistisch signifikant erhöhte Bildung von AFQ₁ in PB-induzierten PC- und NPC-Mikrosomen könnte also auf die Induktion von CYP3A2 zurückgeführt werden. (Favreau und Schenkman et al., 1994).

Bei der Inkubation von Testosteron mit 3-MC induzierten Leberzellen entsteht vorwiegend 2 β - und 15 β -OHT. Die Bildung dieser Metabolite wird durch CYP1A1 und CYP1A2 katalysiert. Außerdem wurde eine Zunahme der CYP2A Produkte wie 7 α - und 6 α -OHT, festgestellt. Diese Beobachtung weicht von Literaturangaben ab (Nagata et al., 1987). Möglicherweise beruht die beobachtete Veränderung der Metabolitenbildung auf dem Altersunterschied der eingesetzten Tiere.

Nach Vorbehandlung von Ratten mit verschiedenen Enzyminduktoren wurde in PC eine verminderte 2α -Testosteronhydroxylase-Aktivität festgestellt. Im Fall von 3-MC war dieser Abfall jedoch sehr gering. Yeowell et al. (1987) hingegen konnten nach Gabe von 3-MC an Ratten eine stark verminderte 2α -OHT-Bildung feststellen, was gleichzeitig mit einem verringerten CYP2C11 mRNA-Gehalt der Leberzellen verbunden war. Da die Induktion von CYP2C11 in männlichen Ratten unter der hormoneller Regulation des Wachstumshormons steht, postulierten die Autoren, daß 3-MC die hormonelle Regulation von CYP2C11 beeinflusst oder daß die Abnahme der Biosynthese von CYP2C11 durch eine direkte Bindung von 3-MC an den Ah-Rezeptor zustande kommt. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte in der niedrigen Dosis von 3-MC (25 mg/kg Körpergewicht) liegen, die in der vorliegenden Arbeit zur Induktion eingesetzt wurde. Yeowell et al. (1987) verwendeten dagegen die doppelte Menge an 3-MC.

Trotz dieser Unterschiede in der Testosteronhydroxylierung führte 3-MC erwartungsgemäß in beiden Zelltypen zu einer eindeutigen Induktion der AFB₁-9 α -Hydroxylase und damit zu einem signifikanten Anstieg der AFM₁-Bildung.

Die Zunahme der Bildungsrate von AFB₁-8,9-Epoxid und AFM₁ in beiden Zellpopulationen nach Gabe von Isosafrol, einen Induktor von CYP1A2, stimmt gut mit der Literatur überein (Koser et al., 1988; Gallagher et al., 1994). Da aber für CYP1A2 kein spezifischer hydroxylierter Metabolit von Testosteron bekannt ist, konnte keine genauere Zuordnung getroffen werden. In NPC-Mikrosomen nahm nach Behandlung mit Isosafrol sowohl der Gesamtumsatz von Testosteron als auch die Bildungsrate einzelner hydroxylierter Testosteronmetaboliten zu, was sich wiederum in einer erhöhten metabolischen Bildung von AFM₁, AFQ₁ und AFB-8,9-Epoxid widerspiegelte.

Wie es aber nach Behandlung mit Isosafrol zu einer erhöhten Bildung von AFQ₁ kommen kann, ist nicht bekannt. Beim Menschen wird hauptsächlich die CYP3A-Unterfamilie durch synthetische Glucocorticoide induziert und ist nicht nur für die Aktivierung sondern auch für die 3α -Hydroxylierung von AFB₁, also für die AFQ₁-Bildung, verantwortlich. Wahrscheinlich sind die CYP3A1/2 der Ratte homolog zu den menschlichen CYP3A4/5 und katalysieren die gleichen enzymatischen Reaktionen. Vlasuk et al. (1982) berichten, daß Isosafrol Glucocorticoidähnliche Induktionseigenschaften aufweist. Die erhöhte Bildung von AFQ₁ könnte dann auf die schwache Induktion von CYP 3A1/2 durch Isosafrol zurückzuführen sein.

Eine Analyse der Testosteronhydroxylierung in PC nach Induktion mit Aroclor zeigt, daß der Anteil an 2α -OHT, das in männlichen Ratten spezifisch durch CYP 2C11 entsteht, stark abnimmt. Im Gegensatz dazu wurde die 2α -Hydroxylierung des Testosterons in NPC-Mikrosomen um den Faktor 2,2 erhöht. Dies stimmt gut überein mit einer früheren Arbeit von Schlemper et al. (1991), in der eine Korrelation zwischen dem Gehalt an der

CYP2C11-abhängigen Testosteron-2 α -Hydroxylierung und der Mutagenität von AFB₁ im Ames-Test festgestellt worden war. Die Ursache für diese Erhöhung des 2 α -OHT in Aroclor-induzierten NPC-Mikrosomen ist im einzelnen noch ungeklärt. Möglicherweise steht diese im Zusammenhang mit einer zelltypspezifischen Regulation des CYP2C11-Isoenzym.

Nach Induktion mit PB, ISO und ARO wird trotz einer verminderten 2 α -Hydroxylierungsrate die Aktivierung von AFB₁, wenn auch nicht durch die drei Induktoren im gleichen Ausmaß, gesteigert. Das deutet daraufhin, daß sich die an der Aktivierung von AFB₁ maßgeblich beteiligten Cytochrom P450-Isoenzyme und die konstitutiven Formen unterschiedlich verhalten. Ein interessanter Befund hierbei war, daß Induktoren, die zu Bioaktivierung von AFB₁ beitragen, gleichzeitig in der Lage waren, entweder die AFM₁- oder die AFQ₁-Bildungsrate zu erhöhen. Die von Schlemper et al. (1991) in PC nach Aroclor-Behandlung festgestellte Korrelation zwischen der Abnahme von 2 α -OHT Aktivität und der reduzierten Mutagenität von AFB₁ läßt sich am besten mit der gleichzeitigen Induktion der AFB₁-9 α -Hydroxylase erklären.

In dieser Arbeit wurde auch die enzymatische Umsetzung von AFB₁ in Mikrosomen der beiden Zelltypen in Anwesenheit einer niedrigen Substratkonzentration [16 μ M] untersucht. Diese Konzentration entspricht der durchschnittlichen umweltrelevanten Belastung mit AFB₁. Dabei wurde festgestellt, daß das Metabolitenmuster bei sättigender (128 μ M) und niedriger (16 μ M) Substratkonzentration ähnlich war. Im Verhältnis zum Gesamtumsatz wurde aber eine erhöhte Aktivierungsrate von AFB₁ zum 8,9-Epoxid beobachtet.

CYP1A2, das in Humanlebermikrosomen die Aktivierung von AFB₁ katalysiert, weist eine sehr hohe Affinität gegenüber AFB₁ auf (Ramsdell & Eaton, 1990; Gallagher et al., 1994). Unsere Ergebnisse unterstützen diese Befunde. Es scheint sowohl in PC- als auch in NPC-Mikrosomen der Ratte ein Cytochrom P450 vorzukommen, das eine hohe Affinität gegenüber AFB₁ aufweist. Es ist also zu vermuten, daß eine beachtliche Gefahr für den Menschen besteht, wenn Aflatoxine in niedrigen Konzentrationen, wie sie in kontaminierten Nahrungsmitteln aufgenommen werden.

Unsere Ergebnisse unterstützten nicht nur den Befund von Ramsdell und Eaton (1994), sie deuten auch darauf hin, daß die Resistenz der NPC gegenüber der kanzerogenen Wirkung von AFB₁ durch die metabolischen Unterschiede in der Biotransformation von AFB₁ in PC und NPC erklärt werden kann.

5.2 Interaktion zwischen AFB₁ und HBV-Infektion in zwei Tiermodellen für chronisch aktive Hepatitis

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit eine der häufigsten Krebsformen beim Menschen. Dabei variiert die Inzidenz dieser Tumorerkrankung beim Menschen in verschiedenen Regionen der Welt sehr stark. So wurde in epidemiologischen Studien gezeigt, daß in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara und in Südostasien (z.B. in China) das hepatozelluläre Karzinom die häufigste maligne Tumorform darstellt. Die Ursachen für den primären Leberkrebs sind vielfältig, wobei die Aflatoxinbelastung der Lebensmittel und die chronische Infektion mit HBV die Hauptfaktoren ausmachen (IARC 1993; 1994).

Aus epidemiologischen Untersuchungen in China ist bekannt, daß bei HBV-Infizierten Patienten unter gleichzeitiger Belastung mit AFB₁ ein 30-fach höheres Risiko besteht, an einem primären Lebertumor zu erkranken, im Vergleich zu Patienten bei denen nur einer der beiden Risikofaktoren vorlag (Ross et al., 1992). Auf molekularer Ebene ist diese Interaktion bisher noch ungeklärt. Eine aus toxikologischer Sicht interessante Hypothese macht eine HBV-Infektion und die damit verbundene Hepatitis für eine verstärkte metabolische Aktivierung von AFB₁ verantwortlich. Um diese Frage zu klären, wurde daher in der vorliegenden Arbeit der in vitro-Metabolismus von AFB₁ in zwei Tiermodellen unter dem Einfluß von der HBV-Infektion untersucht.

5. 2.1 Vergleich der hepatischen Bioaktivierung in HBV-transgenen und Kontrollmäusen

Bei den hier verwendeten HBV-transgenen Mäusen handelt es sich um ein Tiermodell für die chronisch aktive Hepatitis: eine Teilsequenz des menschlichen HBV-Genoms, das für das große Hüllprotein des Oberflächenantigens kodiert, wurde transgen exprimiert und führt zur Überproduktion und Akkumulation des toxischen HBsAg im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen. Es kommt zu einer fortschreitenden chronischen Leberschädigung und anschließend zu der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (Chisari et al., 1989).

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß zwischen Kontrollen und HBV-transgenen Mäusen keine Unterschiede hinsichtlich der hepatischen Aktivierungsrate von AFB₁ bestehen. Überraschendweise kam es sogar zu einer Abnahme des CYP-Gesamtgehaltes und zur Verminderung der COH- und ECOD-Aktivität in Leberfraktionen HBV-transgener Mäusen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß Cytokine, die während der chronischen

Entzündung der Leber vermehrt freigesetzt werden, die Expression bestimmter Cytochrome herabregulieren (Chen et al., 1995; Abdel-Razzak et al., 1993).

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der Testosteronhydroxylierung übereinstimmend mit den Bestimmungen der Enzymaktivität, daß der Gesamtumsatz des Androgens in HBV-transgenen Mäusen niedriger als in Kontrollmäusen ist. Obwohl die Cytochrom P450-Isoenzyme der Maus hinsichtlich der Testosteronhydroxylierung nicht so gut charakterisiert sind wie in der Ratte, gibt es Berichte über zwei immunologisch verwandte, jedoch in ihrer Substratspezifität unterschiedliche Isoformen in der Maus (Negishi & Lindberg, 1989). Das CYP2A4-Isoenzym katalysiert die Testosteron 15 α -hydroxylierung, während CYP2A5 Cumarin zum 7-Hydroxyderivat umwandelt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen festgestellt, daß 15 α -OHT in transgenen Mäusen vermindert gebildet wurde. Zum anderen war die Cumarin-7-hydroxylase Aktivität ebenfalls in HBV-transgenen Mäusen reduziert.

Pasannen et al. (1997) verabreichten Cumarin an Hepatitis A-Virus-infizierte und gesunde Probanden und bestimmten im Urin die ausgeschiedenen Mengen an 7-Hydroxycumarin. In den mit HAV-infizierten Patienten war die Menge dieses Cumarin-metabolit um 40% reduziert im Vergleich zu gesunden Probanden.

Die Tatsache, daß die gleichzeitiger Belastung mit AFB₁ und HBV zu einer erhöhten Inzidenz von Lebertumoren führen kann, wurde in epidemiologischen Studien (Ross et al., 1992; Wild et al., 1993) und im Tierversuchen deutlich (Sell et al., 1991). Nach intraperitonealer Injektion von AFB₁ bei transgenen Mäusen, die das große Hüllprotein des HBV exprimierten (Linie 50-4), stellten Sell et al. (1991) fest, daß im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen die HBV-transgenen Mäuse wesentlich häufiger und früher Tumoren bildeten. Dennoch ist die Relevanz dieser Ergebnisse für die beim Menschen beobachtete Interaktion zwischen dem über Nahrung aufgenommenen Mykotoxin und der HBV-Infektion fraglich.

Der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von AFB₁ zum 8,9-Epoxid und der Expressionsrate bestimmter CYP-Formen in HBV-transgenen Mäuse wurde von Kirby et al. (1994) untersucht. Sie fanden heraus, daß die Expression von CYP2A5 in einzelnen Hepatozyten der HBV-transgenen Mäuse ab dem 9. Lebensmonat zunahm und daß diese Zunahme wiederum mit dem Ausmaß der Leberschädigung korrelierte. Im Alter von 12 Monaten, als die Tiere HCC entwickelt hatten, erreichte die Expressionsrate von CYP2A5 ein Maximum.

Kirby et al. (1994) berichteten außerdem, daß es in den 12 Monate alten HBV-transgenen Mäusen zu einer vermehrten Bildung des AFB₁-8,9-Epoxids kam. Bei genauer Betrachtung dieser Arbeit muß aber festgestellt werden, daß sich die Bildungsrate des AFB₁-8,9-Epoxids in den HBV-transgenen Tieren nicht erhöht hatte, sondern daß sie in den 12 Monate alten Kontrollmäusen vermindert war. In der

vorliegenden Arbeit wurde eine eindeutige Abnahme der COH-Aktivität und der AFB₁-Aktivierungsrate bei den HBV-transgenen Tieren festgestellt. Leider läßt sich zur Korrelation zwischen der o.g. Abnahme der Bildungsrate des AFB₁-8,9-Epoxids und dem Schweregrad der Leberentzündung keine Aussage treffen, da von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lebern (The Jackson Laboratories, USA.) keine histopathologischen Befunden vorlagen.

5.2.2 Vergleich der hepatischen Boitransformation in WHV-infizierten und WHV-freien Waldmurmeltieren

Gentechnisch veränderte Mäusestämme bieten zwar die Möglichkeit, die Interaktion zwischen HBV und AFB₁ zu studieren, was am Menschen ethisch nicht verträglich wäre. Sie liefern aber nur ein unvollständiges Bild, wenn man die Mechanismen der Entzündung in den Mäusen und beim Menschen vergleicht. So fehlt z. B. in den hier verwendeten HBV-transgenen-Mäusen (Linie 50-4) die Immunantwort auf das im Überschuß gebildete große Hüllprotein des HBsAg, während beim Menschen die chronische Leberentzündung auf immunologische Prozesse zurückzuführen ist.

Deshalb wurde die Metabolismusuntersuchungen um ein weiteres Tiermodell für die Hepatitis erweitert. Hierbei handelt es sich um Waldmurmeltiere (engl. Woodchuck) erweitert, die mit dem Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (WHV) infiziert worden waren.

Das infektiöse WHV ähnelt sehr stark dem menschlichen HBV: sowohl die Morphologie des WHV als auch der Verlauf der Hepatitis in dieser Tierspezies ähneln weitgehend dem Prozeß der Leberentzündung beim Menschen (Millman et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die hepatische Aktivierung von AFB₁ in WHV-infizierten Waldmurmeltieren im Vergleich zu Kontrolltieren stark vermindert ist. Darüber hinaus konnte eine gewisse Korrelation zwischen dem Ausmaß der Leberschädigung und der Abnahme der Aktivierungsrate festgestellt werden. Damit ist die von anderen Arbeitsgruppen festgestellte synergistische Interaktion zwischen AFB₁ und Hepatitis-Virus nicht mit der vermehrten Bildung des AFB₁-8,9-Epoxid zu erklären.

Tennant et al. (1990) waren die ersten, die AFB₁ bei Waldmurmeltieren während der akuten Phase der WHV-Infektion applizierten. Sie stellten fest, daß kein behandeltes Tier an einem primären Leberkrebs erkrankte. Aufgrund der kurzen Überlebensdauer der Tiere ist jedoch die Interpretation dieser Ergebnisse nicht eindeutig.

Über eine aufschlußreiche Studie zur Interaktion der beiden Faktoren berichteten Bannasch et al. (1995). Dabei wurde bei einer Dosis von AFB₁, die keine hepatische Läsionen auslöste bei Virus-positiven Tieren im Vergleich zu Virus-freien Kontrolltieren

eine statistisch signifikant erhöhte Leberkrebsrate festgestellt. Außerdem fanden diese Autoren, daß die präneoplastische Foci, die sowohl nach Behandlung mit AFB₁ als auch nach der WHV-Infektion gebildet werden, auf zellulärem Niveau eine sehr starke phänotypische Ähnlichkeit aufweisen. Die Autoren gehen davon aus, daß die beiden Faktoren in ähnlicher Weise Leberkrebs auslösen und dies die Basis für ihre synergistische Interaktion sein könnte.

Den ersten Hinweis auf die mögliche Modulation der Bioaktivierung von AFB₁ durch WHV lieferte eine Arbeit von DeFlora et al. (1989). Diese Autoren verglichen im Salmonella-Mutagenitätstest die Kapazität von Lebermikrosomen aus WHV-positiven und WHV-freien Waldmurmeltieren, AFB₁ zu aktivieren. Dabei wurde das Ausmaß der WHV-Infektion durch den Nachweis des Oberflächenantigens (WHVsAg) im Serum bestimmt, ohne jedoch den Grad der Leberschädigung zu berücksichtigen. Es zeigte sich, daß in 10 von 15 WHV-positiven Tieren die mikrosomenvermittelte Mutagenität sich kaum von der Kontrolltiere unterschied, während bei 5 WHV-infizierten Tieren eine erhöhte bakteriellen Mutagenität festgestellt wurde.

Wie im Kapitel 4.3.2.3 bereits beschrieben, wurden die Stadien der Lebererkrankung der Waldmurmeltiere durch das im Serum nachgewiesene virale Antigen und anhand der histopathologischen Veränderungen der Leber charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit unserer Studie konnte erstmals in Waldmurmeltieren der aktivierte Metabolit des AFB₁, das 8,9-Epoxid, direkt nachgewiesen werden.

Die von uns am Anfang dieser Arbeit gestellte Hypothese ließ sich jedoch nicht bestätigen. Stattdessen wurde in den Tieren mit dem Fortschreiten der chronischen Hepatitis eine verminderte Bildung von AFB₁-8,9-Epoxid festgestellt. Bei den WHV-infizierten Waldmurmeltieren, bei denen die Aktivierung von AFB₁ reduziert war, wurden ebenfalls AFP₁, AFQ₁ und AFM₁ in verminderten Mengen gebildet.

Die Aktivitäten aller untersuchten Cytochrom P450-abhängigen Enzyme wie EROD, ECOD und COH sowie die Testosteronhydroxylierung waren in WHV-freien Waldmurmeltieren deutlich höher als in den WHV-infizierten Waldmurmeltieren. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen dem Gesamtgehalt an Cytochrom P-450 der einzelnen Tiere und der Bioaktivierungsrate von AFB₁ festgestellt werden.

Obwohl hierbei die interindividuelle Variabilität beträchtlich war, beobachtet man einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Stadien der Leberschädigung und den Aktivierungsraten. Abgesehen vom dem Alter und dem Ausmaß der Leberschädigung könnte die großen Schwankungen in den Aktivierungsraten einzelner Tiere auf die Verwendung von Auszuchtieren unterschiedlicher Herkunft zurückzuführen sein. Inwieweit die virale Infektion in der frühen Phase der Erkrankung zur Veränderung des metabolischen Aktivierungsweges von AFB₁ führen kann, bleibt zu untersuchen. Es wäre

auch prinzipiell denkbar, daß der beobachtete Rückgang der Aktivierung durch die nekrotischen Bestandteilen der Leber in der Mikrosomenfraktion verursacht wird. Dem widerspricht jedoch, daß Bannasch et al. (1995) bei jeder Proben entnahme durch lichtmikroskopische Betrachtung nekrotische Bereiche der Leber aussparten.

Die Abnahme des Cytochrom P450-Gesamtgehalts im Verlauf der Hepatitis stimmt gut überein mit Ergebnissen aus vorangegangenen Studien (Mannering & Deloria, 1986; Renton, 1990). Übereinstimmend mit dieser Arbeit ließen sich in Leberproben von HBsAg-chronischen Trägern aus Thailand wesentlich geringere Aktivierungsraten nachweisen als in Proben aus gesunden Kontrollpersonen (Kirby et al., 1993).

Da die Zusammensetzung der Cytochrom P450-Isoenzyme von Waldmurmeltieren bisher nicht untersucht worden ist, können die an der Metabolisierung des AFB₁ beteiligten Enzyme keiner bestimmten Cytochrom P450-Form zugeordnet werden. Ähnliches gilt für die Untersuchung der Testosteronhydroxylierung. Dennoch konnte eine gewisse Korrelation zwischen dem AFB₁-Metabolitenprofil und der Testosteronhydroxylierung festgestellt werden. Das CYP3A4, das beim Menschen für die Epoxidierung und 3 α -Hydroxylierung (AFQ₁-Bildung) des AFB₁ verantwortlich ist, katalysiert ebenfalls z.B. die 6 β -Hydroxylierung des Testosterons. Die Beobachtungen, daß in Lebermikrosomen von Waldmurmeltieren AFB₁-8,9-Epoxid und AFQ₁ als Hauptmetabolite gebildet wurden und daß 6 β -OHT bei der Untersuchung des Testosteronmetabolismus der Hauptmetabolit darstellt, deuten darauf hin, daß die Biotransformation von AFB₁ bei Waldmurmeltiere und beim Menschen Ähnlichkeiten aufweisen.

Im Gegensatz zu den großen Schwankungen im Cytochrom P450-Gehalt wurde festgestellt, daß die Aktivität der Glutathion-S-transferasen (GSTs) in allen Versuchsgruppen unabhängig vom Ausmaß der Leberschädigung, vergleichbar war. Eine Hochregulierung der GST-Aktivität bei gleichzeitiger Herabregulierung der CYP-Expression während der Hepatokanzerogenese wurde auch von anderen Autoren (Kitahara et al., 1984; Di Simplicio et al., 1989) bestätigt und zeigt, daß die Leberzellen Mechanismen besitzen, um sich vor toxische Fremdstoffe zu schützen. Dies geschieht dadurch, daß die Zellen ihren Cytochrom P450-Gehalt vermindern, so daß weniger toxische Metabolite entstehen, die dann durch eine erhöhte GST-Aktivität besser entgiftet werden können .

Alternative Erklärungsmöglichkeiten für den Synergismus zwischen AFB₁ und HBV

Obwohl in HBV-transgenen Mäusen und in WHV-infizierten Waldmurmeltieren der Gesamtgehalt des Cytochrom P450 reduziert war, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Expression von bestimmten Cytochrom P450-Isoformen in einzelnen Hepatozyten verstärkt ist.

Diese Annahme wird unterstützt durch Veröffentlichungen, die zeigen, daß während einer chronisch aktiven Hepatitis die Expression bestimmter Cytochrom P450-Isoformen, die AFB₁ aktivieren können, in vereinzelt Zellen stark erhöht ist. So konnte durch immunhistochemische Untersuchungen an der Leber von Mäusen, die transgen für das große Hüllprotein des HBV (Pellinen et al., 1993) sind und in Hamstern, die mit Leberegel "liver fluke" (*Opistorchis viverrini*) infiziert wurden, nachgewiesen werden, daß die Expression von CYP2A5 in einzelnen Leberzellen erhöht war (Kirby et al., 1994b). Außerdem fanden dieselben Forscher (Kirby et al., 1996) in HBV-infizierten menschlichen Lebern eine erhöhte Expression von CYP2A5, besonders entlang der entzündeten und fibrotischen Bereiche. Deshalb kann man nicht ausschließen, daß sowohl in Waldmurmeltieren als auch in HBV-transgenen Mäusen die Expression bestimmter Cytochrom P450-Isoformen infolge der Entzündung in vereinzelt Zellen erhöht ist.

Eine mögliche Erklärung für die Abweichung von der Arbeit von Kirby et al. (1994a, 1994b) könnte dann auf das methodische Vorgehen bei der Mikrosomenpräparation zurückgeführt werden. Bei der Homogenisierung der Leber wäre dann die erhöhte Expression von CYP2A5 in einzelnen Hepatozyten durch die Anwesenheit einer Vielzahl von Hepatozyten mit einer normalen bzw. verminderten CYP2A5-Ausstattung „verdünnt“ worden.

Die synergistische Interaktion von AFB₁ und HBV während der Entstehung von Lebertumoren könnte auch dadurch erklärt werden, daß die beiden Faktoren über verschiedenen Mechanismen zur Ausbildung eines primären Lebertumors führen. So wird das Mykotoxin seine kanzerogene Wirkung sehr Wahrscheinlich durch das AFB₁-8,9-Epoxid entfalten, während die Viren durch eine chronische Leberentzündung möglicherweise reaktive Sauerstoffspezies generieren. Diese könnten oxidative DNA-Schäden hervorrufen, und dadurch die Lebertumorigenese initiieren oder fördern. Eine solche Wirkung von HBV konnte in Versuchstieren gezeigt werden (Liu et al., 1994; Ohshima & Bartsch, 1994). Weitere Hinweise sprechen dafür, daß eine durch HBV-Infektion ausgelöste Entzündungsreaktion zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies führt. So konnte in HBV-transgenen Mäusen (Hagen et al., 1994) und in menschlichen HCC (Shimoda et al., 1994) 8-Oxo-Guanin, ein sensitiver Marker für oxidative DNA-Schäden, vermehrt gefunden werden.

Trotz der verstärkten Bildung von 8-Oxo-Guanin wurden keine Mutationen im ras- oder p53-Gen gefunden (Pasquinelli et al., 1992; Hagen et al., 1994). Auch Rivkina et al. (1996) konnten in hepatozellulären Karzinomen von Waldmurmeltieren, die durch chronische Infektion mit WHV und gleichzeitige Behandlung mit AFB₁ ausgelöst worden waren, keine Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen feststellen. Die Autoren schließen daraus, daß die Entstehungsweise von Leberzellkrebs in diesem Versuchsmodell nicht im Einklang mit den häufig beobachteten p53 Mutationen bei hepatozellulären Karzinomen des Menschen aus HBV- und AFB₁-belasteten Regionen steht (Bressac et al., 1991; Hsu et al., 1991).

Obwohl AFB₁-Exposition und HBV-Infektion ohne zusätzliche Einflüsse, zumindest in Versuchstieren, als komplette Kanzerogene zur Bildung von Lebertumoren führen können, läßt sich doch die Interaktion der beiden Faktoren auf der Basis des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese erklären. So beruhen beispielsweise die bisherigen Studien in HBV-transgenen Mäusen oder WHV-infizierten Waldmurmeltieren auf der tumorinitiierenden Wirkung von HBV/WHV und Promotion durch AFB₁. Einige Autoren spekulieren, daß AFB₁ die Initiation auslöst und das Virus die Promotion eines bereits initiierten Hepatozyten bewirkt (Gu, 1988). So würden infolge des HBV-induzierten Zellverlustes nicht nur normale Hepatozyten sondern auch solche Leberzellen proliferieren, die durch AFB₁ genetisch geschädigt worden sind. Nach einer bestimmten Latenzzeit könnten diese genetisch veränderten proliferierenden Hepatozyten dann zur Bildung von Lebertumoren führen. Nach den vorliegenden Ergebnisse scheint sowohl die Reihenfolge der beiden Faktoren als auch die klare Abgrenzung der einzelnen Phasen für die synergistischen Effekte nicht entscheidend zu sein. Allerdings gibt es bisher keine Studie bei der AFB₁ als tumorinitiierend und HBV als Tumorpromotor berücksichtigt wurde.

5.3 Einfluß von TGF- β_1 auf die Expression von CYP2A5 in Kulturen von Maushepatozyten

In zahlreiche Arbeiten wird über die Beteiligung verschiedener Wachstumsfaktoren und Cytokinen an der Hepatokanzerogenese berichtet (Yeh et al., 1987). Dokumentiert ist zum Beispiel, daß TGF- β_1 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der hepatischen Fibrose spielt (Nagy et al., 1991). Darüber hinaus wurde in Patienten mit HCC auch eine erhöhte Plasmakonzentration von TGF- β_1 festgestellt (Ito et al., 1991). Außerdem wird berichtet, daß bei chronisch mit HBV-infizierten Patienten eine signifikant erhöhte Expression von CYP2A6 in Hepatozyten zu beobachten ist, die sich in unmittelbarer Nähe der durch die Fibrose veränderten Leberabschnitten befinden (Kirby et al., 1996). Diese Beobachtung ist von besonderer Bedeutung, da CYP2A6 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von AFB₁ zum genotoxischen Metabolit spielt. Aus diesen Gründen

bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin, im Zusammenhang mit den vorangegangenen Untersuchungen zur Interaktion von AFB₁ mit HBV in der Lebertumorentstehung, die Expression von CYP2A5 (homolog zum CYP2A6 des Menschen) unter Einfluß von TGF-β₁ in kultivierten Maushepatozyten zu untersuchen.

Die Beschränkung auf Maushepatozyten war erforderlich, da das zum humanen CYP2A6-Isoenzym homologe murine CYP2A5 besonders in der Maus exprimiert wird, während es in Ratten kaum detektierbar ist (Yamano, 1990).

Es konnte gezeigt werden, daß bei den hier eingesetzten Konzentrationen von TGF-β₁ (0,1-0,5 ng/ml) keine signifikant verminderte Vitalität der Zellen auftrat (Abb. 4.17). Dies bedeutet, daß die Veränderungen der Enzymaktivitäten nicht auf einem direkten Einfluß von TGF-β₁ auf die Vitalität beruht. Wie durch Western Blotting gezeigt werden konnte, führte die Behandlung der kultivierten Zellen mit Phenobarbital zu einer Erhöhung der CYP2A5 Proteinmenge in den Maushepatozyten.

Diese Induktionseffekt und die damit assoziierte Erhöhung der COH-Aktivität zeigen, daß Phenobarbital nicht nur die CYP2B-Unterfamilie sondern auch CYP2A5-induziert. Dieses Isoenzym besitzt keine immunologische Verwandtschaft mit CYP2B1/2 und katalysiert spezifisch die Hydroxylierung von Cumarin (Negishi et al., 1989; Lang et al., 1989).

Zu den Induktoren von CYP2A5 gehören neben Phenobarbital Substanzen mit sehr unterschiedliche Strukturen, wie Pyrazol und Kobalt sowie Hepatotoxine (Pelkonen et al., 1993). Nach Salonpää et al. (1994 und 1995) erhöht Phenobarbital die COH-Aktivität und Proteinmenge von CYP2A5 durch eine Steigerung der CYP2A5 Transkription, während Pyrazol und Kobalt zur Stabilisierung der CYP2A5 mRNA führen. Nach Berichten von Salonpää et al. (1994) führen cAMP und andere Substanzen, die direkt oder indirekt den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, zu einem Anstieg der basalen und Phenobarbital-induzierbaren COH-Aktivität und der CYP2A5 mRNA-Menge. Die Autoren schließen daraus, daß die Induktion von CYP2A5 über eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein-Kinase A zustande kommt.

Die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an TGF-β₁ zum Kulturmedium führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der Expression von CYP2A5.

Cytokine, die während der Entzündungsreaktion freigesetzt werden, können die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme beeinflussen (Shedlofsky et al., 1987; Williams et al., 1991). Dazu gehören IL-1, IL-6 und IFN-γ, die während der Akut-Phase-Reaktion als Hauptmediatoren an der Entzündungsreaktion beteiligt sind und dabei den Cytochrom P450-Gehalt und die Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme reprimieren. Die Mechanismen für diese Effekte sind noch unbekannt.

Abdel-Razzak et al. (1994) haben in diesem Zusammenhang gezeigt, daß TGF- β_1 bei einer Konzentration von 2 ng/ml in kultivierten humanen Primärhepatozyten zu einer völligen Hemmung der durch 3-MC induzierbaren CYP1A-mRNA und EROD-Aktivität führt. Wie die gleichzeitige Behandlung mit Cycloheximid zeigt, ist für diese suppressive Wirkung die de novo Proteinbiosynthese nötig. Daraus wurde geschlossen, daß die Hemmwirkung von TGF- β_1 auf die Biosynthese eines „Repressors“ der Transkription beruht.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei einer niedrigen TGF- β_1 -Konzentration (0,1 ng/ml), eine leicht erhöhte Expression von CYP2A5 auf Proteinebene sowie eine leicht erhöhte COH-Aktivität festgestellt.

Die Beobachtung, daß bestimmte Cytokine unter Umständen auch die CYP450-Aktivitäten steigern können, wurde ebenfalls von Kurokohchi et al. (1993) und Kirby et al. (1994) berichtet. Kurokohchi et al. (1993) zeigten, daß nach in vivo Applikation von Interleukin-2 (IL-2) bei Ratten der Cytochrom P450-Gehalt und die Aktivität der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen zunehmen. Die Autoren spekulieren, daß IL-2 einen indirekten Einfluß auf die fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Hepatozyten besitzt, da die Rezeptoren für IL-2 sich hauptsächlich auf T-Lymphozyten befinden und die Wirkung erst nach 48 Stunden auftritt.

In Anlehnung an die Ergebnisse mit IL-2 (Kurokohchi et al., 1993) führt der Befund aus der TGF- β_1 Studie in der vorliegenden Arbeit zu der Annahme, daß TGF- β_1 einen direkten Einfluß auf die Hepatozyten ausübt.

Mehrere Autoren haben gezeigt, daß TGF- β_1 in kultivierten Hepatozyten die Apoptose induziert. (Oberhammer et al., 1991, Lin et al., 1992). Um diese Wirkungen von TGF- β_1 auszuschließen, wurde bei den in dieser Arbeit eingesetzten TGF- β_1 Konzentrationen die Apoptoseraten untersucht. So wurde gezeigt, daß nach (0,5 ng/ml) TGF- β_1 die Apoptoserate höher lag als bei niedrigeren Konzentration. Nach Trennung der DNA im Agarosegel war jedoch keine für die Apoptose charakteristische „DNA-Leiter“ zu erkennen. Oberhammer et al. (1994) fanden auch in Hepatozyten nach in vivo und in vitro Applikation von TGF- β_1 keine DNA-Fragmentierung, obwohl sie die für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen nachweisen konnten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß DNA-Fragmentierung erst in einem späteren Stadium der Apoptose auftritt. Schließlich wird auch diskutiert, daß die DNA-Fragmentierung nicht Apoptose-spezifisch sei, da sie auch während der Nekrose auftritt (Collins et al., 1992). Dafür sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit. In DNA-Extrakten von adherenten und nicht-adherenten Hepatozyten war eine für Apoptose typische „DNA-Leiter“ zu sehen. obwohl es sich hierbei eher um eine durch den enzymatischen Leberverdau erfolgte Zellschädigung handelt.

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß neben den allgemeinen Problemen der Isolierung und Kultivierung der primären Hepatozytenkultur die Reproduzierbarkeit der einzelnen Isolierungen unbefriedigend blieb. Ein entscheidendes Problem bei der Isolierung von Maushepatozyten im Vergleich von z.B. Rattenhepatozyten ist ihre Empfindlichkeit gegenüber dem enzymatischen Verdau durch Collagenase. Der Grund dafür ist unbekannt. Deshalb sind noch weitere Arbeiten erforderlich, in denen die optimalen Bedingungen für die Isolierung und Kultivierung der Hepatozyten der Maus untersucht werden.

5.4 Ausblick

Wie im Kapitel 1.5 dargestellt, ist die Entstehung von Leberkrebs ein komplexer Prozeß, der über viele Jahre andauert und bei dessen Entstehung zahlreiche Faktoren eine Rolle spielen. Daher ist die Frage nach der zelltypspezifischen Resistenz der NPC gegenüber AFB₁ oder nach der Ursache für die synergistische Interaktion zwischen AFB₁ und HBV allein durch in vitro Metabolismusstudien nicht zu beantworten.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse erweitern jedoch das Verständnis über die Biotransformation eines humantoxikologisch relevanten Mykotoxins. Darüber hinaus dienen die hier etablierte Methoden als Grundlage zur Aufklärung weiterer noch ungelöste Fragen. So könnte z. B. den Hinweisen nachgegangen werden, daß einzelne Leberzellpopulationen unterschiedliche Reparaturkapazitäten für O⁶-Methylguanin aufweisen (Bedell et al., 1982). Der Unterschied in der Sensitivität von PC und NPC könnte nämlich auch in der unterschiedlichen Ausstattung diese Leberzelltypen mit Reparaturenzymen liegen, die zum Beispiel das AFB₁-Guanin-Addukt in die Formamidopyrimidin-Form umsetzen. Dies könnte toxikologische Konsequenzen haben, da die Umwandlung des Primäraddukts zum geöffneten Ring einen stabilisierenden Effekt hat.

Hinsichtlich der Interaktion zwischen AFB₁ und HBV-Infektion scheinen die Waldmurmeltiere ein geeignete Tiermodell zu sein, wobei jedoch noch die Charakterisierung der Cytochrom P450-Formen in dieser Spezies erforderlich wäre. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß die HBV-Infektion zu verschiedenen Stadien der Leberentzündung führt, die anscheinend unterschiedliche Auswirkungen auf die metabolische Aktivierung von AFB₁ haben. Um diese Hinweise abzusichern, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6 Zusammenfassung

- * Die Untersuchung zur Regulation der Expression von AFB₁-metabolisierenden Enzymen in verschiedenen Zelltypen der Ratte ergab, daß die Aktivität der AFB₁-9a-hydroxylase sowohl in Parenchym- als auch in Nichtparenchymzellen der Leber meßbar ist, daß sie aber in beiden Leberzelltypen unterschiedlich reguliert wird. Die enzymatische Epoxidierung von AFB₁ in der 8,9-Position führt zum ultimalen Kanzerogen, während die Hydroxylierung am Kohlenstoff-9a eine Detoxifizierung darstellt. Nach der HPLC-Analyse der AFB₁-Metabolite konnte gezeigt werden, daß in Nichtparenchymzellen (NPC) das Verhältnis von 9a-Hydroxylierung zu 8,9-Epoxidierung höher als in Parenchymzellen (PC) ist. Die AFB₁-9a-hydroxylase fördert insbesondere in den NPC der Leber die Bildung des weniger gentoxischen Metaboliten AFM₁ und konkurriert daher um Aktivierung von AFB₁ zum mutagenen und kanzerogenen 8,9-Epoxid. Dieser metabolische Unterschied scheint also einen Beitrag zur Resistenz der Nichtparenchymzellen der Leber gegenüber der hepatokanzerogenen Wirkung von AFB₁ zu leisten.
- * Nach Behandlung von Ratten mit verschiedenen Enzyminduktoren konnte gezeigt werden, daß die Induktion der AFB₁-9a-hydroxylase nicht nur in der Maus sondern auch in der Ratte sowohl in Parenchymzellen als auch in Nichtparenchymzellen über den "Ah-Genlocus" reguliert wird.
- * Die Charakterisierung des Isoenzymmusters der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen durch die stereo- und regiospezifische Hydroxylierung von Testosteron ergab ein qualitativ ähnliches Metabolitenmuster in beiden Zelltypen. Somit kann man davon ausgehen, daß auch Nichtparenchymzellen die für die Biotransformation von AFB₁ verantwortlichen Cytochrom P450 Isoenzyme besitzen.
- * In einem Vergleich der Biotransformation von AFB₁ mit mikrosomalen Leberfraktionen von transgenen HBV-Mäusen und Kontrollmäusen wurde keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dagegen wurde bei Virus-infizierten Waldmurmeltieren eine deutlich reduzierte Bildung des AFB₁-8,9-Epoxids beobachtet. Obwohl eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Leberproben der Waldmurmeltiere bestand, konnte z.T. ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Stadien der Leberschädigung und den Metabolismusraten festgestellt werden, wobei die metabolische Aktivierung mit zunehmender Leberschädigung abzunehmen scheint. Auch hinsichtlich der Aktivitäten verschiedener Cytochrom P450 abhängiger Monooxygenasen konnte eine weitgehende Übereinstimmung mit den durch HPLC ermittelten Metabolitenprofilen des AFB₁ festgestellt werden.

- * Aufgrund der besonderen Bedeutung des murinen CYP2A5 (ortholog zum humanen CYP2A6) bei der Aktivierung von AFB₁ wurde der Einfluß von TGF-β₁ auf CYP2A5 in Primärkulturen von Maushepatozyten untersucht. TGF-β₁, aus der Gruppe der Cytokine, wird als Mediator bei Entzündungsprozessen in der Leber freigesetzt. Durch Messung der Aktivität der Cumarin-7-hydroxylase sowie durch Bestimmung der Proteinmenge von CYP2A5 mittels Western Blotting wurden erste Aussagen über die Induzierbarkeit des CYP2A5-Isoenzym in kultivierten Parenchymzellen der Maus erhalten. Nur bei einer niedrigen TGF-β₁-Konzentration wurde eine leicht erhöhte Expression von CYP2A5 festgestellt, ansonsten führte die Behandlung der kultivierten Maushepatozyten mit TGF-β₁ zu einer dosisabhängigen Verminderung der Expression von CYP2A5.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A, (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 44: 707-715.
- Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA; (1988): *The Liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York.
- Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV, Gonzalez; (1990): Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc. Natl .Acad .Sci .USA* 87: 4790-4793.
- Baertschi SW, Raney KD, Stone MP, Harris TM; (1988): Preparation of the 8,9-epoxide of the mycotoxin aflatoxin B1: the ultimate carcinogenic species. *J. Am. Chem Soc.* 110: 7929 -7931.
- Balasano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Elfassi E, Will H, Levero M ; (1991): Transactivation of c-fos and c-myc protooncogenes by both full-length and truncated versions of the HBV-x protein. In: Hollinger B, Lemon SM, Margolis HS, eds, *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 572-576.
- Bannasch P, Kohshkhou NI, Hacker HJ, Radaeva S, Mrozek M, Zillmann U, Kopp-Schneider A, Haberkorn U, Elgas M, Tolle T; (1995): Synergistic hepatocarcinogenic effect of hepadnaviral infection and dietary aflatoxin B1 in woodchucks. *Cancer Res.* 55: 3318-3330
- Bedell MA, Lewis JG, Billings KC, Swenberg JA; (1982): Cell specificity in hepatocarcinogenesis. Preferential accumulation of O⁶-methylguanine in target cell DNA during continuous exposure of rats to 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 42: 3079-3083.
- Bennett JW; (1987): *Mycotoxins, Mycotoxicoses, Mycotoxicology and Mycopathologia*. *Mycopathologia* 100: 3-5.
- Beutler TM, Slone D and Eaton DL; (1992): Comparison of the aflatoxin B1-8,9-epoxide conjugating activities of two bacterially expressed alpha class glutathione S-transferase isoenzymes from mouse and rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 597–603.
- Bock KW, Lilienblum W, Fischer G, Schirmer G; (1987): The role of conjugation reaction in detoxication. *Arch. Toxicol.* 60: 22-29.
- Bradford M; (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.

- Braun L, Mead J, Panzica M, Mikumo R, Bell G, Fausto N; **(1988)**: Transforming growth factor- β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1539-1543.
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M; **(1991)**: Selective G to T transversions of p53 gene in hepatocellular carcinomas. *Nature* 350: 429-431.
- Brouwer A, Barelds RL, Knook DL; **(1984)**: Centrifugal separation of mammalian cells. In the centrifugation, a practical approach, 2nd. Edition; Hrsg.: D Rickwood, IRL Press, Oxford and Washington DC, 183-217.
- Brouwer A, Wisse E and Knook DL; **(1988)**: Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat-storing cells. In: *The Liver : Biology and Pathology*, Second Edition; Hrsg.: IM Arias, WB Jakoby, H Popper, D Schachter and DA Shfritz, Raven Press, New York, 683-697.
- Bruce RD; **(1990)**: Risk assessment of aflatoxins II. Implementations of human epidemiology data. *Risk. Anal.* 10: 561-69.
- Buetow KH, Sheffield VC, Zhu M, Zhou T, Shen F-M, Hino O, Smith M, McMahon BJ, Lanier AP, London WT, Redeker AG and Govindarajan S; **(1992)**: Low frequency of p53 mutations observed in a diverse collection of primary hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9622-9626.
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R; **(1992)**: Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends-Pharmacol-Sci.* 13: 245-51.
- Burschell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PLM, Lancet D, Mulder CJ, Roy Chowdhury J, Siest G, Telphly TR und Mackenzie PI; **(1991)**: The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: Suggested nomenclature based on evolutionary divergence: *DNA*: 10: 487-494.
- Burke DM, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT; **(1985)**: Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: A series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3337.
- Busby WF and Wogan GN. **(1984)**: Aflatoxins. *Chem. Carcinogen.* 2, 945-1136.
- Chen J-Q, Ström A, Gustafsson J-Ä, Morgan ET; **(1995)**: Suppression of the constitutive expression of cytochrom P450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: Comparison with induction of acute phase Genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol. Pharmacol.* 47: 940-947.
- Chetsanga, CJ, Frenette, GP; **(1983)**: Excision of aflatoxin B1-imidazole ring opened guanine adducts from DNA by formamidopyrimidine-DNA-glycosylase. *Carcinogenesis* 4: 997-1000.

- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli c, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD; **(1989)**: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59: 1145-1156.
- Ch`ih JJ, Lin T, Devlin TM; **(1983)**: Effect of inhibitors of microsomal enzymes on aflatoxin B1-induced cytotoxicity and inhibition of RNA synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 15-21.
- Clayson DB, Mehata R, Iverson F; **(1994)**: Oxidativ DNA-damage- the effects of certain genotoxic and operationally non genenotoxic carcinogens. *Mutation Res.* 317: 25-42.
- Coles, B und Ketterer B; **(1990)**: The role of glutathione und glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 47-70.
- Collins R, Harmon B, Gobe G, Kerr J; **(1992)**: Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criteria for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61: 451-453.
- Conney AH; **(1982)**: Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 42: 4875-4917.
- Coulombe RA, Shelton DW, Sinnhuber RO, Nixon; **(1982)**: Comparative mutagenecity of aflatoxins using Samonella/trout hepatic enzym activation system. *Carcinogenesis* 3: 1261-64.
- Croy, RG, Wogan, GN; **(1981)**: Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 41: 197-203.
- David H and Reinke P; **(1987)**: The concept of the "Perisinusoidal Functional Unit" of the liver- importance to the pathological processes. *Exp. Pathol.* 32: 193-224.
- De Flora S, Hietanen E, Bartsch H, Camoirano A, Izzoti A, Bagnasco M, Millman I; **(1989)**: Enhaced metabolic activation of chemical hepatocarcinogenesis in woodchucks infected with hepatitis B virus. *Carcinogenesis* 10:1099-1106.
- Decad GM, Dougherty KK, Hsieh DPH, Byard JL; **(1979)**: Metabolism of aflatoxin B1 in cultured mouse hepatocytes: Comparison with rat and effects of cyclohexene oxide and diethylmaleate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50: 429-36.
- Degen GH and Neumann HG; **(1981)**: Differences in aflatoxin B1-susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B1-epoxide. *Carcinogenesis* 2: 299-306.
- Di Simplicio P, Jensson H, Mannervik B; **(1989)**: Effects of inducers of drug metabolism on basic forms of mouse glutathion S-transferase. *Biochem J.* 263: 679-685.
- Doll R, and Peto R; **(1994)**: The causes of cancer: Quantitaive estimtes of avoidable risks of cancer in the United Sates today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1191-1309.

- Dunsford HA, Sell S, Chisari FV; **(1990)**: Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res.* 50: 3400-3407.
- d'Arville CN, Nouri-Aria KT, Johnson P, Williams R; **(1994)**: Regulation of insulin-like growth Factor II gene expression by hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 13: 310-315.
- Eaton DL, Ramsdell HS, Neal GE; **(1994)**: Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD. Eds. *The Toxicology of aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. San Diego: Academic Press, pp45-72.
- Essigman JM, Croy RG, Nadzan AN, Busby WH, Reinhold VN, Buchi G, Wogan GN; **(1977)**: Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1187-1874.
- Estabrook RW; **(1978)**: The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Meth. Enzymology* 52: 212 .
- Fahimi HD, Gray BA, Herzog BA, and Herzog V; **(1976)**: Cytochemical localization of catalase and peroxidase in sinusoidal cells of rat liver. *Lab. Invest.* 34: 192-201.
- Faletto MB, Koser L, Battula N, Townsend GK, Maccubbin AE, Gelboin HV, Gurtoo HL; **(1988)**: Cytochrome P₃-450 cDNA encodes aflatoxin B1-4-hydroxylase. *J Biol. Chem.* 263: 12187-12189.
- Farber E; **(1984)**: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals. GHA Cowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 44: 5463-5474.
- Forrester LM, Neal GE, Judah DJ, Glancey MJ, Wolf CR; **(1990)**: Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8306-8310.
- Fourel G, Trepo C, Bougueleret L, Henglein B, Ponzetto A, Tiollais P, Buendia M; **(1990)**: Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors. *Nature* 347: 294 -298.
- Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL; **(1994)**: Role of human and microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 54: 101-108.
- Gerin JL, Cote PJ, Korba BE, Tennant BC; **(1989)**: Hepadnavirus-induced liver cancer in woodchucks. *Cancer Detect. Prev.* 14: 227-229.
- Gopalan P, Jensen DE, Lotlikar PD; **(1992)**: Glutathion conjugation of microsome-mediated and synthetic aflatoxin B1-8,9-epoxide by purified glutathione S-transferases from rats. *Cancer Lett* 64: 225-233.
- Gottlieb E, Lindner S, and Oren M; **(1996)**: Relationship of sequence specific transactivation and p53-regulated apoptosis in interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Cell Growth Differ.* 7: 301-10.

- Greenlee WF, Poland A; **(1978)**: An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity : Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 205: 596-605.
- Groopman JD Wogan GN, Roebuck BD, Kensler TW; **(1994)**: Molecular biomarkers for aflatoxin and their application to human cancer prevention. *Cancer Res.* 54: 1907-1911.
- Groopman JD, Cain LG, Kensler TW; **(1988)**: Aflatoxin exposure in human Populations: measurements and relationship to cancer. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 19: 113-43.
- GU JR; **(1988)**: Molecular aspects of human hepatic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 9: 697-703.
- Gurtoo HL, Dahms RP, Paigen B; **(1978)**: Metabolic activation of aflatoxins related to their mutagenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 965-972.
- Hagen TM, Huang S, Curnutte L, Fowler P, Martinenz V, Wehr CM, Ames BN, Chisari FV; **(1994)**: Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12808-12812.
- Hall AJ, Wild CP; **(1994)**: Epidemiology of aflatoxin-related disease. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, Eds. DL Eaton, JD Groopman, pp.233-58. New York: Academic.
- Harrison PJ, May L, Hayes JD, Neal GE; **(1990)**: Glutathione-S- transferase localization in aflatoxin B1-treated rat livers. *Carcinogenesis*, 11: 927-931.
- Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI, Kerr LA, Peacock SD, Neal GE; **(1991)**: Ethoxyquin induced resistance to aflatoxin B1 in the rat is associated with the expression of a novel alpha-class glutathione-S-transferase subunit, Yc2, which possesses high catalytic activity for aflatoxin B1-8,9-epoxide. *Biochem. J.* 279: 279-98.
- Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI, Neal GE ;**(1991)**: Contribution of the glutathion S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacol. Ther.* 50: 443-472.
- Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R, Yuspa SH; **(1983)**: Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumorigenic initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 304: 67-69.
- Henschler D; **(1991)**: Genetische Schäden durch Strahlen und andere Umwelttoxene. *Akt. Radiol.* 1: 116-119.
- Hertzog, PJ, Lindsay Smith, JR and Garner, RC; **(1980)**: A high pressure liquid chromatography study on the removal of DNA-bound aflatoxin B₁ in rat liver and in vitro. *Carcinogenesis.* 1: 787-793.

- Heyes JD, Kerr LA, Harrison DJ, Cronshaw AD, Ross AG, Neal GE; **(1990)**: Preferential overexpression of the class alpha rat Ya2 glutathione S-transferases subunit in the livers bearing aflatoxin-induced pre-neoplastic nodules. *Biochem. J.* 268: 295-302.
- Hino O, Tabata S, Hotta Y; **(1991)**: Evidence for increased in vitro recombination with insertion of human hepatitis virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9248-9252.
- Howley PM; **(1991)**: Role of the Human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res. Suppl.* 51. 5019s-5022s
- Hsieh DPH, Cullen JM, Ruebner BH; **(1984)**: Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 22: 1027.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC; **(1991)**: Mutational hotspot in the p53 gene in human in hepatocellular carcinomas. *Nature* 350: 427-428.
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Doerr JA; **(1988)**: Mycotoxin Interactions in poultry and swine. *J. anim. Sci.* 66: 2351-2355.
- IARC **(1976)**: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: some naturally occurring substances, Bd. 10. IARC Sci. Publ., pp51-72, Lyon.
- IARC **(1987)**: International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Suppl. 7, Lyon.
- IARC **(1993)**: International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56: 245-395 Lyon .
- IARC **(1994)**: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Hepatitis B Virus. IARC Publications, Vol. 59, World Health Organization, 45-164, Lyon.
- Imaoka S and Funae Y; **(1990)**: Purification and characterization of rat pulmonary cytochrome P-450, *J. Biochem.* 108: 33-36.
- Imaoka S, Ikemoto S, Shimada T, Funae Y; **(1992)**: Mutagenic activation of aflatoxin B1 by pulmonary, renal and hepatic cytochrom P450s from rats: *Mutat. Res.* 269: 231-236.
- Ishii M, Kamataki, Kato; **(1986)**: Mutagenic activation of aflatoxin B₁ by several forms of purified cytochrome P-450. *Mutat. Res.* 174: 85.
- Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, Kiso S, Yabuchi D; **(1991)**: Elevated levels of transforming growth factor β messenger RNA and its polypeptide in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 51: 4080-4083.
- Iyer RS, Coles BF, Raney KD, Thier R, Guengerich FP, Harris TM; **(1994)**: DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin B1: Mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1603-1609.

- Jennings GS, Heck R, Oesch F, and Steinberg P; **(1994)**: Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B₁ in cultured rat hepatocytes and nonparenchymal cells: Implications for Tomorigenesis: *Toxicol. and Appl. Pharmacol* 129: 86–94.
- Jennings GS, Oesch F, Steinberg P. **(1992)**: In vivo formation of aflatoxin B₁-DNA adducts in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver. *Carcinogenesis*. 13: 831-835.
- Johnson WW, Yamazaki H, Shimada T; **(1997)**: Aflatoxin B₁-8,9-epoxide hydrolase in the presence of rat and human epoxide hydrolase. *Chem Res. Toxicol.* 10: 672-676.
- Judah DJ, Hayes JD, Yang J-C, Lian L-Y, Roberts GCK, Farmer PB, Lamb JH, Neal GE; **(1993)**: A novel aldehyde reductase with activity towards a metabolite of aflatoxin B₁ is expressed in rat liver during carcinogenesis and following the administration of an antioxidant. *Biochem. J.* 292: 13-18.
- Kamatagi T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R; **(1982)**: *Life Sci.* 31, 2603-2610.
- Kensler TW, Egner PA, Trush MA, Bueding E, Groopman JD; (1985): Modification of aflatoxin B₁ binding to DNA in vivo in rats fed phenolic antioxidants, ethoxyquin and a dithiothione. *Carcinogenesis* 6: 759-63.
- Kensler TW, Groopman JD, Eaton DL, Curphey TJ, Roebuck BD; **(1992)**: Potent inhibition of aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis by the monofunctional enzyme inducer 1,2-dithiole-3-thione. *Carcinogenesis* 13: 95-100.
- Kirby GM, Wolf CR, Neal GE, Judah DJ, Henderson CJ, Srivatankul P ; Wild CP; **(1993)**: In vitro metabolism of aflatoxin B₁ by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis* 14: 2613 -2620.
- Kirby GM, Chemin I, Montesano R, Chisari FV, Lang MA, Wild CP; **(1994a)**: Induction of specific cytochrom P450s involved in aflatoxin B₁ metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. *Mol. Carcinogenesis* 11: 74 -80.
- Kirby GM, Gatist G; Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA; **(1996)**: Overexpression of Cytochrome P-450 Isoforms Involved in Aflatoxin B₁ Bioactivation in Human Liver with Cirrhosis and Hepatitis. *Environ. Toxicol. Pathol.* 24: 458-467.
- Kirby GM, Pelkonen O, Vatanasapt V, Camus A, Wild CP, Lang MA; **(1994b)**: Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrom P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol. Carcinog.* 11: 81-89.
- Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N; **(1984)**: Changes in molecular forms of rat hepatic glutathion transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 44: 2698-2703.
- Koser PL, Faletto MB, Maccubbin AE, Gurtoo HL; **(1988)**: The genetics of aflatoxin B₁ metabolism. Association of the induction of aflatoxin B₁-4- hydroxylase with the transcriptional activation of cytochrome P₃-450 gene. *J. Biol. Chem.* 263: 12584-95

- Kurokochi K, Matsuo Y, Yoneyama H, Nishioka M, Ichikawa Y; **(1993)**: Interleukin 2 induction of cytochrome P450 monooxygenase systems of rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 45: 583-592.
- Laemmli UK; **(1970)**: Basic procedure for SDS Gel Electrophoresis. *Nature* 227: 680-685.
- Lafranconi WM, Glatt H and Oesch F; **(1986)**: Xenobiotic metabolizing enzymes of rat liver nonparenchyma cells. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 84: 500-511.
- Lang MA, Juvonen RO, Jarvinen P, Honkakoski P, Raunio H; **(1989)**: Mouse liver P450Coh: genetic regulation of the pyrazole-inducible enzyme and comparison with other P450 isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 271: 139-148.
- Levin W, Thomas PE, Reick LM, Wood AW, Ryan DE; **(1984)**: Multiplicity and functional diversity of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 isoenzymes. In: *Proceedings of IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*. Hrsg.: W Paton, J Mitchell, P Turner; Vol. 3, 203-209, Macmillan, London.
- Lin JG, Chou CK; **(1992)**: In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor- β 1. *Cancer Res.* 52: 385-388.
- Lin L, Yang F, Ye Z, Xu E, Yang C, Zahng C, Wu D, Nebert DW; **(1991)**: Case-control study of cigarette smoking and primary hepatoma in aflatoxin-endemic region of China: A prospective effect. *Pharmacogenetics* 1: 79-85.
- Liu L, Massey TE; **(1992)**: Bioactivation of aflatoxin B1 by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrom P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. *Carcinogenesis*. 13: 533-539.
- Liu RH, Jacob JR, Hotchkiss JH, Cote PJ, Gerin JL, Tennant BC; **(1994)**: Woodchuck hepatitis virus surface antigen induces nitric oxide synthesis in hepatocytes: Possible role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 15: 2875-2877.
- Liu YL, Roebuck BD, Yager JD, Groopman JD, Kensler TW; **(1988)**: Protection by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) against the hepatotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93:44-51.
- Lotlikar PD, Jhee EC, Insetta SM, Clearfield MS, Clearfield MS; **(1984)**: Modulation of microsome mediated aflatoxin B1 binding to exogenous and endogenous DNA by cytosolic glutathion S-transferases in rat and hamster livers. *Carcinogenesis* 5: 269-76.
- Mannering GJ, Deloria LB; **(1986)**: The pharmacology and toxicology of the interferons: An overview. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 455-515.
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, and Jörnvall H; **(1985)**: Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to

- several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7202-7206.
- Mannervik B, Danielson UH; **(1988)**: Glutathione transferases- structure and catalytic activity. Crit. Rev. Biochem. 23: 283-337.
- Marks F, Fürstenberger G; **(1995)**: In: Chemical Induction of Cancer. Modulation and Combination Effects. Hrsg.: J.C. Arcos et al. pp125-160, Birkhäuser-Verlag, Boston.
- Martin CN and Garner RC; **(1977)**: Aflatoxin B1-oxide generated by chemical or enzymatic oxidation of aflatoxin B1 causes guanine substitution in nucleic acids. Nature 267: 863-65.
- McMahon G, Davis EF, Huber LJ, Kim Y, Wogan GN; **(1990)**: Characterisation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in aflatoxin B1-induced rat liver tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 110-8.
- Metcalf SA, Colley PJ, Neal GE; **(1981)**: A comparison of the effects of pretreatment with phenobarbitone and 3-Methylcholanthrene on the metabolism of aflatoxin B1 rat liver microsomes and isolated hepatocytes. Chem. Biol. Interact. 35: 145-157.
- Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM and Ketterer B; **(1991)**: Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. Biochem. J. 274: 409-414.
- Millman I, Southam L, Halbherr T, Simmones H, Kang CM; **(1984)**: Woodchucks hepatitis virus experimental infection and natural occurrence. Hepatology 4 : 817-823.
- Monroe DH Eaton DL; **(1987)**: Comparative effects of butylated hydroxyanisole on hepatic in vivo DNA binding and in vitro biotransformation of aflatoxin B1 in the rat and mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 90: 401-9.
- Moore MA, Nakagawa K, Satoh, K, Ishikawa T, Sato K; **(1987)**: Single GST-P positive cells putative initiated hepatocytes. Carcinogenesis 8: 483-486.
- Morgenstern R, Guthenberg C, De Pierre JW; **(1982)**: Purification initial characterisation and demonstration, that it is not identical to cytosolic glutathione transferases A, B and C. Eur. J. Biochem. 128: 243-248.
- Mulder GJ, Jakoby WB; **(1990)**: Sulfation. In: Conjugation reactions in drug metabolism: an integrated approach, (Mulder, GJ, ed.), pp107-161. Taylor & francis, New York.
- Mullaart E, Lohman PHM, Berends F & Vijig J; **(1990)**: DNA damage metabolism and aging. Mutation Res. 237: 189-210.
- Nagata K, Matsunaga T, Gillette JR, Gelboin HV, Gonzales FJ; **(1987)**: Rat testosterone 7 α -hydroxylase. J. Biol. Chem. 262: 2787-2793.

- Nagy P, Scharf Z, Lapis K; **(1991)**: Immunohistochemical detection of transforming growth factor- β 1 in fibrotic liver disease. *Hepatology* 14: 269-273.
- Nebert DW and Gonzalenz FJ; **(1987)**: P450 Genes: Structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem* 56: 945-993.
- Negishi M, Lindber R, Burkhart B, Ichikawa T, Honkakoski P, Lang MA; **(1989)**: Mouse steroid 15 α -hydroxylase gene family: Identification of type II P-45015 α as a coumarin 7-hydroxylase. *Biochemistry* 28: 4169-4172.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalenz FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW; **(1993)**: The P450 Superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51.
- Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R; **(1992)**: Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor- β 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5408-5412.
- Oesch F and Wolf CR; **(1989)**: Properties of the microsomal and cytosolic glutathione transferases involved in hexachloro-1:3-butadiene conjugation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 353-359.
- Oesch F, Jerina DM, Daly JW; **(1971)**: Substrate specificity of a hepatic epoxide hydrase in microsomes and in a purified preparation: evidence for homologues enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 144: 253-261.
- Oesch F, Wagner H, Platt KL, Arand M; **(1992)**: Improved sample preparations for the testosterone hydroxylation assay using disposable extraction columns. *J. Chromatog.* 58: 232-235.
- Oesch F, Wolf R; **(1989)**: Properties of microsomal and cytosolic glutathion transferases involved in hexychloro-1,3-butadiene conjugation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 353-359.
- Oesch F; **(1973)**: Mamalian epoxid hydrases: Inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 3: 305-340.
- Okuda H, Potter BJ, Blades B, McHugh TA, Jacobs LN, Berk PD; **(1989)**: Dose related effects of Phenobarbital on hepatic glutathione-S- transferase activity and ligandin levels in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 17: 677-682.
- Omura T, Sato R; **(1964)**: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2385.
- Oshima H, and Bartsch H; **(1994)**: Chronic infection and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in hepatocarcinogenesis. *Mutation Res.* 305: 253-264.

- Pasquinelli C, Bahavani K, Chisari FV; (1992): Multiple oncogenes and tumor suppressor genes are structurally and functionally intact during hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res.* 52: 2823-2829.
- Patel T and Gores G; (1995): Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 21: 1725-1741.
- Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Mäenpää J, Lang MA; (1993): Coumarin 7-hydroxylase characteristics and regulation in mouse and man. *J. Irisch. Coll. Phys. Surg.* 22: 24-28.
- Pellinen P, Stenbäck F, Rautio A, Pelkonen O, Lang M, Pasanen M; (1993): Response of mouse liver coumarin 7-hydroxylase activity to hepatotoxins: dependence on strain and agent and comparison to other monooxygenases. *Naunyn-Schmiedberger's Archives of Pharmacology* 348: 435-443.
- Pitot HC; (1989) : Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 599-607.
- Platt KL; (1986): Metabolismus und biologische Aktivität von Dibenz[a,h]anthracene: Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Popper H, Roth L, Purcell RH, Tennant BC, Gerin JL; (1987): Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 866-870.
- Pott P; (1775): Chirurgische observations relative to the cataract, the polypus of nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the modification of the toes and feet. Hawe, Clarke, and Collins, London (neugedruckt in : natl. cancer Inst. Monogr. 10, 7-3, 1963).
- Prescott DM, Flexer AS; (1990): Krebs-Fehlsteuerung von Zellen; Ursachen und Konsequenzen. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1104-8.
- Quinn BA, Crane TL, Kocal TE, Best SJ, Cameron RG, Rushmore TH, Farber E, Hayes MA; (1990): Protective activity of different hepatic cytosolic glutathione S-transferases against DNA binding metabolites of aflatoxin B1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105: 351-363.
- Ramsdell HS, Eaton DL; (1990): Species susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenesis: comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer Res.* 50: 615-620.
- Raney VM, Harris TM, Stone MP; (1993): DNA conformation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7-adducts by aflatoxin B1 8,9-epoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 64-68.
- Raney VM, Shimada T, Kim DH, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP; (1992): Oxidation of aflatoxin B1 aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: Significance of aflatoxin Q1 as a detoxication product of aflatoxin B1. *Chem Res. Toxicol.* 5: 202-210.

- Raney, KD, Meyer DJ, Ketterer B, Harrius TM, and Guengerich FP; **(1992)**: glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 470-478.
- Renton KW, Knickle LC; **(1990)**: Regulation of hepatic cytochrome P-450 during infectious disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 777-781.
- Rich KJ und Lodola A; **(1987)**: Characterisation of the xenobiotic-metabolizing capacity of non-parenchymal cells. *Biochem. Soc. Transact.* 15: 662-663.
- Rivkina M, Cote PJ, Robinson WS, Tennant BC, Marion PL; **(1996)**: Absence of mutations in the p53 tumor suppressor gene in woodchuck hepatocellular carcinomas associated with hepadnavirus infection and intake of aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 17, 2689-2694.
- Robertson IG, Zieger E, Goldstein JA; **(1983)**: Specificity of rat liver cytochrome P-450 isoenzymes in the mutagenic activation of benzo[a]pyrene, aromatic amines and aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 4: 93-96.
- Roebuck BD and Wogan GN; **(1979)**: Species comparison of in vitro metabolism of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 37: 1649-1656.
- Roebuck, BD, Maxuitenko, YY; **(1994)**: Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxin carcinogenesis. *Epidemiology of aflatoxin-related disease*. In the *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, ed. DL Eaton, JD Groopman, pp. 27-44, New York: Academic.
- Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Henderson BE; **(1992)**: Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 339: 9343-46.
- Sabbioni G, Skipper PL, Buchi G, Tannenbaum SR; **(1987)**: Isolation and characterisation of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis* 8: 819-24.
- Salhab AS, Edwards GS; **(1977)**: Comparative in vitro metabolism of aflatoxin B1 by liver preparations from animals and humans. *Cancer Res.* 37: 1016-21.
- Salonpää P, Krause K, Pelkonen O, Raunio H; **(1995)**: Up-regulation of CYP2A5 expression by porphyrinogenic agents in mouse liver. *Naunyn-Schiedeborg's Arch. Pharmacol.* 351: 446-452.
- Salonpää P, Pelkonen O, Kojo Am Pasanen M, Negishi M, Raunio H; **(1994)**: Cytochrome P450A5 expression and inducibility by phenobarbital is modulated by cAMP in mouse primary hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205: 631-637.
- Sasse D; **(1986)**: Liver structure and innervation. In: *regulation of hepatic metabolism*. Hrsg.: RG Thurman, FC Kaufmann, K Jungermann, 3-25 Plenum Press, New York, London,

- Schirmacher V; **(1989)**: Krebs-Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaft. Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- Schlemper B, Harrison J, Garner RC, Oesch F, Steinberg P; **(1991)**: DNA binding, adduct characterisation and metabolic activation of aflatoxin B1 catalysed by isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cells. Arch. Toxicol. 65: 633-639.
- Schlte-Hermann R, Bursch W, Grasl Kraupp B, Mullauer L, Ruttkaynedecky B; **(1995)**: Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver: Mutation Res. 333: 81-87.
- Sell S, John M, Hunt JM, Dunsford HA and Chisari FV; **(1991)**: Synergy between Hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice. Cancer Res. 51: 1278-1285
- Shedlofsky SI, Swim AT, Robinson JM, Gallicchio VS, Cohen DA, McClain CJ; **(1987)**: Interleukin-1 depresses cytochrome P450 levels and activities in mice. Life Sci. 40: 2331-6.
- Shimada T, Guengerich FP; **(1989)**: Evidence for cytochrom P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 462-465.
- Shimoda R, Nagashima M, sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H; **(1994)**: Increased formation of oxidative DNA damage 8- hydroxydeoxy-guanosine in human livers with chronic hepatitis. Cancer Res. 54: 3171-3172.
- Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, Damico, Pagliaro, L; **(1991)** Hepatocellular carcinoma: a worldwide problem and the major risk factors. Dig. Dis. Sci., 36, 962-972.
- Statistisches Bundesamt ;**(1995)**Todesursachen in Deutschland. In: Gesundheitswesen, ban. 4, pp4-127. Metzler-Poeschel, Stuttgart.
- Steinberg P, Lafranconi WM, Wolf CR, Waxman DJ, Oesch F, Friedberg T; **(1987)**: Xenobiotic metabolizing enzymes are not restricted to parenchymal cells in rat liver. Mol. Pharmacol. 32: 463-470.
- Steinberg P, Schladt L, Dienes HP, Timms CC und Oesch F; **(1988)**: Microsomal and cytosolic epoxide hydrolase, the peroxisomal fatty acid β -oxidation system and catalase: activities, distribution and induction in rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. Eur. J. Biochem. 176: 39-45.
- Steinberg P, Schlemper B, Molitor E, Seidel A, Platt KL, Oesch F; **(1990)**: Rat liver kupffer and endothelial cell-mediated mutagenicity of several polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin B1. Environ. Health perspect. 88: 71-76.
- Steinberg P, Schramm, H, Thomas H, Schladt L, Obertson LW und Oesch F; **(1989)**: The distribution, induction and isoenzyme profile of glutathione transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal, kupffer und endothelial cells. Biochem. J. 264 : 737-744.

- Stranger RC; (**1993**): The glutathione S-transferase GSTM1 0 locus and cancer susceptibility. In: Tew KD, Pickett CB, Mantle TJ, Mannervik B, Hayes JD, Eds. structure and functions of glutathione transferases.
- Stresser DM, Bailey GS, Williams DE; (**1994**): Indole-3-carbinol and β -naphthoflavone induction of aflatoxin B1 metabolism and cytochromes P-450 associated with bioactivation and detoxication of aflatoxin B1 in the rat. Drug Metab. Dispos. 22: 383-391.
- Swenson DH, Lin J-K, Miller EC, Miller JA; (**1977**): Aflatoxin B1-2-3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B1 and B2 to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo. Cancer Res. 37: 172-81.
- Snyder RL, Tyler G, Summers J; (**1982**): Chronic hepatitis and Hepatocellular carcinoma associated with WHV. Am J. Pathol. 107: 422-425.
- Tennant BC, Hornbuckle WE, Yeager AE, Baldwin BH, Sherman WK, Anderson WI, Steinberg H, Cote PJ, Korba BE, Engle RE, Gerin JL; (**1990**): Effects of aflatoxin B1 on experimental woodchuck hepatitis virus infection and hepatocellular carcinomas. In: F.B. Hollinger, S.M. Lemon H. Margolis (eds.), Viral Hepatitis and Liver Disease. pp599-600. Baltimore, Williams & Wilkins Co.
- Tokino T and Matsubara K; (**1994**): Chromosomal sites for Hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma. J. Virol. 65: 6761-6764.
- Tomatis L, Aitio A, Wilbourn J, Shuker L; (**1993**): Human carcinogens so far identified. Jpn. J. Cancer Res. 80: 795-807.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J; (**1979**): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Biochemistry 11: 4350-4354.
- van der Hoeven; (**1984**): Assay of hepatic microsomal testosterone hydroxylases by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 13: 57.
- Vlasuk G, Ryan, Reik, Thomas, Levin, Walz; (**1982**): Multiplicity, strain differences and topology of phenobarbital-induced cytochrome P-450 in rat liver microsomes. Biochemistry 21: 789.
- Vlasuk GP, Ryan DE, Thomas PE, Levin W, and Walz FG; (**1982**): Polypeptide patterns of hepatic microsomes from Long-Evans rats treated with different xenobiotics. Biochemistry, 21: 6288-6292.
- Wake K; (**1980**): Perisinusoidal stellate cells (fat storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. Int. Rev. Cytol. 66: 303-353.

- Waterhouse, Muir JC, and Powell J; **(1982)**: Cancer incidence in five continents. IARC Publications, Vol. IV, No. 42, World Health Organization, Lyon.
- Weibel ER, Stäubli W, Gnägi RH, Hess FA; **(1969)**: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J. cell Biol.* 42: 68-91.
- Wild CP, Fortuin M, Donato F, Whittle HC, Hall AJ, Wolf CR, And Montesano R; **(1993)**: Aflatoxin, liver enzymes and Hepatitis B-virus infection in Gambian children. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* 2: 555-61.
- Wild CP, Janse LAM, Cova L, Montesano R; **(1993)**: Molecular dosimetry of aflatoxin exposure: contribution to understanding the multifactorial etiopathogenesis of primary hepatocellular carcinoma with particular reference to hepatitis B virus. *Environ. Health Perspect.* 99: 115-122.
- Wisse E and Knook DL; **(1979)**: The Investigation of sinusoidal cells: A new approach to the study of liver function. In: Popper, H and Schäffner, F. Eds. *Progress in liver diseases* Vol. Vi, Grune & Stratton, 153-171.
- Wisse E; **(1977)**: Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver. In: Wisse E and Knook DL. Eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. 33-60, Elsevier Biomeical Press, Amsterdam, New York.
- Wogan G; **(1973)**: Aflatoxin carcinogenesis. In: *Methods in Cancer Research*, ed. H Busch 309-44.
- Wolf CR; **(1986)**: Cytochrome P-450s: Polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. *TIG*, 2: 209-214.
- Wong ZA, Hsieh DPH; **(1980)**: The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55: 115-25.
- Wood AW, Wilocki PG, Chang RL, Levin W, Lu AYH, Yagi H, Hernandez O, Jerina DM, Conney AH; **(1976)**: Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene benzoring epoxids. *Cancer Res.* 36: 3358-3366.
- Yamagawa K, Ichikawa K ; (1915). Experimentielle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülse. *Mitt. Med. Fak. Kaiserl. Univ. Tokio* 15: 295-344.
- Yamano S, Tatsuno J, and Gonzalenz FJ; **(1990)**: The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry* 29: 1322-1329.
- Yeh YC, Tsai JF, Chuang LY, Yeh MW, Tsai JH, Florine DL, Tam JP; **(1987)**: Elevation of transforming growth factor alpha and its relationship to the epidermal growth factor and alpha-fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 47: 896-901.

Yeowell HN, Waxman D, Wadhera A, Goldstein JA; **(1987)**: Suppression of the constitutive male specific rat hepatic cytochrome P450 2C and its mRNA by 3, 4, 5, 3', 4', 5',-hexachlorobiphenyl and 3-methylcholanthren. *Mol. Pharmacol.* 32: 340-347.

Yoshizawa H, Hchimaruru R, Kamataki T, Kato R, Ueno Y; **(1982)**: Metabolism and activation of aflatoxin B1 by reconstituted cytochrome P-450 system of rat liver. *Cancer Res.* 42: 1120-1124.

Zabel B; **(1993)**: Tumorprädisposition und hereditäre Mutationen. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie* (Fahrig, R, ed.), pp113-133. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.

Zhang YJ, Chen CJ, Lee CS, Haghghi B, Yang GY, Wang LW, Feitelson M and Santella R; **(1994)**: Aflatoxin B1-DNA adduct and hepatitis B virus antigens in hepatocellular carcinoma and non-tumorous liver tissue. *Carcinogenesis* 12: 2247-2252.

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. F. Oesch, Leiter des Institutes für Toxikologie der Universität Mainz, für die Überlassung des Themas. Er ermöglichte mir die Durchführung der Dissertation in einer idealen wissenschaftlichen Atmosphäre mit interdisziplinären Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. U. Pindur, vom Institut für Pharmazie, für seine Interesse an meiner Arbeit und für die Begutachtung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich sehr herzlich Herrn Prof. Dr. P. Steinberg danken. Seine ständige Unterstützung, Anregungen und Freundlichkeit bei allen wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zu besonders großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. K.-L. Platt verpflichtet, für seine hervorragende Betreuung der analytischen Aspekte dieser Arbeit. Herr Prof. Platt stand mir stets als hilfsbereiter Ansprechpartner zur Seite, nicht nur während der experimentellen Tätigkeit sondern er zeigte auch einen unermüdlichen und gewissenhaften Einsatz bei der kritischen Durchsicht meines Manuskriptes.

Herzlich danken möchte ich auch Frau R. Heck für die Einarbeitung in die Tätigkeit der Hepatozytenisolierung und für ihre tatkräftige Unterstützung bei der alltäglichen Arbeit im Labor.

Ebenso gilt mein aufrichtiger Dank Frau M. Tommasone für die Einführung in die HPLC und die erfolgreiche Zusammenarbeit in wichtigen Phasen der Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn PD. Dr. M. Arand für seine freundliche Hilfe bei EDV-technischen Problemen.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Platt, insbesondere bei Dr. C. Degenhardt und Dr. M. Reindl sowie bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Steinberg, Herrn T. Fischer, Frau K. Geißelmann und Dr. C. Schleger, für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des toxikologischen Institutes für die freundliche und rücksichtsvolle Unterstützung bedanken. Ich möchte mich besonders bei denjenigen Mitarbeitern bedanken, die mir bei der Bewältigung der deutschen Sprache- die zwar nicht immer gerade einfach ist, mir aber doch manchmal Spaß machte- ihre Zeit opferten.

Zum Schluß, aber um so herzlicher, bedanke ich mich bei meiner Frau, die mich mit Liebe und Geduld unterstützt hat.

Publikationsliste

Artikel

- * M. Gemechu-Hatewu, K.-L. Platt, F. Oesch and P. Steinberg:
“Distribution and induction of aflatoxin B₁-9a-hydroxylase activity
in rat liver parenchymal and non-parenchymal cells“
Arch. Toxicol. 70: 553-558 (1996)

- * Mekonnen Gemechu-Hatewu, Karl-Ludwig Platt, Franz Oesch,
Hans-Jörg Hacker, Peter Bannasch and Pablo Steinberg:
“Metabolic activation of aflatoxin B₁ to aflatoxin B₁-8,9-epoxide
in woodchucks undergoing chronic active hepatitis“
Int. J. Cancer 73 : 587-591 (1997)

Poster

M. Gemechu-Hatewu, W. Siegmund, F. Jänchen, E. Scheuch and
G. Franke: “Procainamide N-acetylation in isolated perfused rat liver-
effects of pravastatin, terbutaline, propranolol, and hyperglycaemia“
Presentiert auf dem 35. Frühjahrstagung der Deutsche Gesellschaft für
experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.
15.-17. März 1994, Mainz.
Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Suppl. 349 (1994).

Vortrag

Gemechu-Hatewu M., Platt K.-L., Oesch F., Bannasch P., Steinberg P.
(Mainz/Heidelberg)
“Metabolische Aktivierung von Aflatoxin B₁ in zwei experimentellen Modellen für
die chronisch-aktive Hepatitis“
präsentiert bei dem 38. Frühjahrstagung der Deutsche Gesellschaft für
experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.
11.- 13. März 1997, Mainz
Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Suppl. 352 (1997)

Vortragsbeitrag:

F. Oesch, M. Gemechu-Hatewu, H. Kroth, M. Arand, K.-L. Platt,
A. Seidel and P. Steinberg:
Drug metabolising enzymes and chemical hepatocarcinogenesis.“
(Fifth European Meeting on Experimental Hepatocarcinogenesis
June 1996, Huddinge, Sweden)