

**„Untersuchungen zur Toxizität und Biotransformation  
an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT“**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Ute Kürschner

geb. am: 19.08.1972 in: Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Gutachter /in: 1. Prof. Dr. A. Langner  
2. Prof. Dr. A. Hilgeroth  
3. Prof. Dr. G. Bendas

Halle/ Saale, 19. November 2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000013037**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013037>]

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Zielstellung</b> .....	3
<b>3 Theoretische Grundlagen</b> .....	4
<b>3.1 Funktion und Aufbau der menschlichen Haut</b> .....	4
<b>3.2 UV-Strahlung und deren Einfluss auf die Haut</b> .....	6
<b>3.3 Die HaCaT- Keratinozyten- Zelllinie</b> .....	7
<b>3.4 Das Cytochrom P 450-Enzysystem</b> .....	8
3.4.1 Die Familie CYP 1.....	12
3.4.2 Die Familie CYP 2.....	13
3.4.3 Die Familie CYP 3.....	13
3.4.4 Die Familie CYP 4.....	14
3.4.5 Induktion und Inhibition.....	15
<b>3.5 Biotransformation</b> .....	18
3.5.1 Phase-I-Reaktionen.....	18
3.5.2 Phase-II-Reaktionen.....	19
3.5.3 Bestimmung der Enzymaktivität.....	19
3.5.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD).....	19
3.5.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD).....	20
3.5.3.3 Testosteron- Metabolisierung.....	21
3.5.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB).....	23
<b>3.6 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)</b> .....	24
3.6.1 Neutralrottest.....	25
3.6.2 MTT- Test.....	25
<b>3.7 BioRad- Proteinbestimmung</b> .....	26
<b>4 Material und Methoden</b> .....	27
<b>4.1 HaCaT- Keratinozyten- Zellkultur</b> .....	27
4.1.1 Kulturbedingungen, Subkultivierung und Passagierung der Keratinozyten..	27
<b>4.2 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)</b> .....	28
4.2.1 Neutralrottest.....	28
4.2.2 MTT- Test.....	29
4.2.3 NR- und MTT- Test bei Bestrahlungsversuchen.....	29
<b>4.3 Bestimmung der CYP-450-Enzymaktivität</b> .....	30
4.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD).....	30
4.3.1.1 Extinktionsspektrum.....	30
4.3.1.2 Kalibrierung.....	30
4.3.1.3 Durchführung.....	30
a) Ermittlung der Grundaktivität.....	31
b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren.....	31
c) Phase-II- Reaktionen (Glucuronidierung- / Sulfatierung).....	32
d) Bestrahlung mit UVA und UVB.....	32

4.3.2	7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) .....	33
4.3.2.1	Extinktionsspektrum .....	33
4.3.2.2	Kalibrierung .....	33
4.3.2.3	Durchführung .....	34
	a) Ermittlung der Grundaktivität; Einsatz von Induktoren / Inhibitoren .....	34
	b) Bestrahlung mit UVA und UVB .....	35
4.3.3	Testosteron- Metabolisierung .....	35
4.3.3.1	HPLC- Analytik, Kalibrierung .....	35
4.3.3.2	Durchführung .....	36
	a) Ermittlung der Grundaktivität .....	36
	b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren .....	36
	c) Bestrahlung mit UVA und UVB .....	37
4.3.3.3	Ermittlungen der Wiederfindungsraten nach Extraktion .....	37
4.3.4	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen- Reduktion (DAB) .....	38
4.3.4.1	Extinktionsspektrum .....	38
4.3.4.2	Kalibrierung .....	38
4.3.4.3	Durchführung .....	38
	a) Ermittlung der Grundaktivität .....	38
	b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren .....	38
<b>4.4</b>	<b>BioRad- Proteinbestimmung</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>UV- Exposition</b> .....	<b>40</b>
4.5.1	UVA .....	40
4.5.2	UVB .....	41
	4.5.2.1 Vergleich von natürlichem mit künstlichem UVB- Licht .....	41
<b>4.6</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Medien, Supplemente und sonstige Lösungen für die Zellkultur</b> .....	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>42</b>
<b>4.9</b>	<b>verwendete Lösungen</b> .....	<b>43</b>
<b>4.10</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Wachstumsverhalten</b> .....	<b>46</b>
5.1.1	Wachstumsverhalten ohne regelmäßigen Wechsel des Mediums .....	46
5.1.2	Wachstumsverhalten mit Wechsel des Mediums nach je 24 Stunden .....	49
5.1.3	Zellzahl und Proteingehalt .....	52
<b>5.2</b>	<b>Viabilitätsassays der verwendeten Substanzen</b> .....	<b>54</b>
5.2.1	Neutralrot- Test .....	54
	5.2.1.1 Substrate .....	54
	5.2.1.2 Reaktionsprodukte .....	56
	5.2.1.3 Induktoren .....	59
	5.2.1.4 Inhibitoren .....	62
5.2.2	MTT- Test .....	63
	5.2.2.1 Substrate .....	63
	5.2.2.2 Reaktionsprodukte .....	67
	5.2.2.3 Induktoren .....	70
	5.2.2.4 Inhibitoren .....	73

<b>5.3 Bestimmung der Enzymaktivität</b> .....	76
5.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD) .....	76
5.3.1.1 Bestimmung der Grundaktivität .....	76
5.3.1.2 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren .....	78
5.3.1.3 Phase-II- Reaktionen (Glucuronidierung- / Sulfatierung) .....	82
5.3.1.4 Einfluss von UVA- Strahlung .....	83
a) EROD nach UVA- Bestrahlung .....	83
b) MTT nach UVA und EROD .....	86
5.3.1.5 Einfluss von UVB- Strahlung .....	87
a) Vergleich von natürlichem mit künstlichem UVB- Licht .....	88
b) EROD nach UVB- Bestrahlung .....	89
c) MTT nach UVB und EROD .....	92
d) Neutralrot nach UVB und EROD .....	94
5.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) .....	96
5.3.2.1 Bestimmung der Grundaktivität, der Induzierbarkeit und Inhibition .....	96
5.3.2.2 Einfluss von UVA- Strahlung .....	100
5.3.2.3 Einfluss von UVB- Strahlung .....	103
5.3.3 Testosteron- Metabolisierung .....	107
5.3.3.1 Charakterisierung aller bei der Umsetzung relevanter Substanzen ...	107
5.3.3.2 Bestimmung der Grundaktivität .....	109
5.3.3.3 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren .....	110
5.3.3.4 Einfluss von UVA- Strahlung .....	115
5.3.3.5 Einfluss von UVB- Strahlung .....	117
5.3.3.6 Ermittlung der Wiederfindungsraten nach Extraktion .....	119
5.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzol-Reduktion (DAB) .....	120
5.3.4.1 Bestimmung der Grundaktivität .....	120
5.3.4.2 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren .....	120
<b>6 Diskussion</b> .....	123
<b>7 Zusammenfassung</b> .....	134
<b>8 Ausblick</b> .....	137
<b>9 Literaturverzeichnis</b> .....	138

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Strukturformeln**

### **Danksagung**

### **Lebenslauf**

### **Erklärung**

## Abkürzungen und Synonyme

2 $\alpha$ -OH-T	2 $\alpha$ -OH-Testosteron = 2 $\alpha$ -OH-Testo
3- MC	3-Methylcholanthren
6 $\beta$ -OH-T	6 $\beta$ -OH-Testosteron = 6 $\beta$ -OH-Testo
7- EC (= EC)	7-Ethoxycoumarin (= Ethylumbelliferone od.: 7-Ethoxy-2H-1-benzopyran-2-on)
7- ER (= ER)	7-Ethoxyresorufin
7- HC (= HC)	7-Hydroxycoumarin (= Umbelliferon od.: 7-Hydroxy-2H-1-benzopyran-2-on)
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ - Hydroxysteroiddehydrogenase
$\alpha$ -NP	$\alpha$ -Naphthoflavon
ADH	Alkoholdehydrogenase
Andro	4-Androsten-3,17-Dion (= Androstendion)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
A.p.	Aqua purificata (gereinigtes, demineralisiertes Wasser)
$\beta$ -NP	$\beta$ -Naphthoflavon
BSA	Bovine plasma albumin (Rinderalbumin)
Clo	Clofibrat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DAB	4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen
DAD	Diodenarraydetektor (Detektor der HPLC- Anlage)
Dexa	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DL	Deutschland
ECOD	7-Ethoxycoumarin-O- Deethylase bzw. -Deethylierung
EndR	Endoplasmatisches Retikulum
EROD	7-Ethoxyresorufin-O- Deethylase bzw. -Deethylierung
FE	Flächeneinheiten
FKS	Fötales Kälberserum
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
LF	Lebensfähigkeit
MAO	Monoaminoxidase
ml/ $\mu$ l	Mililiter/ Mikroliter
mM	Milimolar, Milimol pro Liter (= $\mu$ mol/ml)
MTP	Mikrotiterplatte (= Gewebekulturplatte)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
$\mu$ M	mikromolar, Mikromol pro Liter (= nmol/ml)
nM	Nanomolar; Nanomol pro Liter (= pmol/ml)
nmol	Nanomol
NHK	Normal adult Human Keratinocytes
NR	Neutralrot
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
POD	Phenacetin-O-Deethylase
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PZK	polyzyklische Kohlenwasserstoffe
Pro	Proadifen (= SKF-525A oder: 2-Diethylaminoethyl-2,2-Diphenylvalerat)
pmol	Pikomol

Reso	Resorufin
Rif	Rifampicin (= 3-(((4-Methyl-1-piperazinyl)imino)-methyl)rifamycin)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TAO	Triacetyloleandomycin (= Oleandomycintriacetat oder: Troleandomycin)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Testo	Testosteron (= 17 $\beta$ -Hydroxyandrost-4-en-3-one )
wf	wasserfrei

## 1 Einleitung

Biotransformation ist die Gesamtheit aller biochemischen Veränderungen an Fremdstoffen im Organismus. Die einzelnen Prozesse laufen meist in 2 Phasen ab, in denen die Stoffe über Oxidation, Reduktion, Hydrolyse sowie Konjugation zu entsprechenden Metaboliten mit veränderter chemischer Struktur umgewandelt werden. Die mit diesen Reaktionen verbundenen Änderungen der physiko-chemischen Eigenschaften der Moleküle führen in der Regel zur Verbesserung der Exkretionsfähigkeit sowie zur Modifizierung pharmakologischer und toxischer Eigenschaften [109]. Somit ist die Biotransformation normalerweise ein protektiver Prozess, der den Organismus schnellstmöglich von Xenobiotika befreien soll. Es gibt allerdings auch Reaktionen, die zur Bioaktivierung oder Biotoxifizierung von Fremdstoffen führen bzw. deren Verweildauer im Körper verlängern. Im Rahmen der Entwicklung von Arzneistoffen sind Biotransformationsuntersuchungen etabliert und entsprechend dem Arzneimittelgesetz vorgeschrieben. Aus den Ergebnissen können sowohl Aussagen zur Erklärung der Pharmakokinetik als auch zum Mechanismus von Nebenwirkungen und Toxizität abgeleitet werden. Darüber hinaus besteht ein wichtiges Potential in der Entwicklung von neuen Leitstrukturen aus Metaboliten, wenn diese eine höhere pharmakologische Wirksamkeit erhalten oder eine neue Wirkqualität gewinnen. Daher sind vom Gesetzgeber Untersuchungen zum Metabolismus sowohl in der präklinischen als auch in der klinischen Phase der Entwicklung neuer Arzneimittel gefordert. Bei tierexperimentellen *in vivo*- Untersuchungen werden üblicherweise einem geeigneten Versuchstier über verschiedene Applikationswege die zu testenden Wirkstoffe verabreicht und über einen bestimmten Zeitraum verschiedene Körperflüssigkeiten getrennt aufgefangen und gesammelt. Mittels spezieller präparativer und analytischer Verfahren können die entstandenen Metabolite isoliert und identifiziert werden [109]. Mit diesen *in vivo*- Untersuchungen wird das fremdstoffmetabolisierende Potential des Gesamtorganismus erfasst. Teilprozesse können besser mit *in vitro*- Methoden charakterisiert werden. Bei solchen Verfahren werden im allgemeinen isolierte perfundierte Organe, isolierte und kultivierte Zellen, permanente Zelllinien sowie subzelluläre Strukturen eingesetzt. Hierbei wird die zu testende Substanz dem Inkubationsmedium zugesetzt und nach entsprechender Versuchszeit die entstandenen Metabolite isoliert und charakterisiert. Diese Systeme unterscheiden sich durch die verschiedenen biologischen Organisationsstufen. Grundsätzlich muss die Auswirkung des Grades der Komplexizität auf die Biotransformation berücksichtigt werden [109].

Für den Stoffwechsel der meisten Pharmaka besitzt die Leber mit einer hohen Kapazität an metabolisch aktiven Enzymen die größte Bedeutung. Infolge ihrer zentralen Aufgabe innerhalb der Entgiftungsprozesse im Organismus stellt sie das am besten untersuchte Organ dar [151]. Daneben lassen sich auch Beteiligungen extrahepatischer Gewebe, beispielsweise des Darms, der Niere, Lunge, Plazenta oder der Haut, an Biotransformationsreaktionen im menschlichen oder tierischen Körper nachweisen [21;85;195]. Die Haut, die als äußere Begrenzung des Organismus dem direkten Kontakt mit zahlreichen Fremdstoffen und Umweltagenzien ausgesetzt ist, rückt dabei in den Blickpunkt des Interesses metabolischer Untersu-

chungen. Ihre Schutz- und Barrierefunktion wird sowohl mechanisch über die Hornhaut als auch biochemisch durch die in den Keratinozyten lokalisierten Isoenzyme des Cytochrom P450- Systems realisiert [18;42;51;175].

Biotransformationsreaktionen in der Haut können limitierende Faktoren einer dermatologischen Arzneimitteltherapie darstellen. Daher ist die Kenntnis der enzymatischen Abbaureaktionen in den metabolisch aktiven Zellen der Haut für die Optimierung der topischen Therapie unbedingt erforderlich. Darüber hinaus sind entsprechende Kenntnisse auch für die Effizienz einer Behandlung mit transdermalen therapeutischen Systemen von Bedeutung.

Über die Ausbildung der Cytochrome in der menschlichen Haut liegen, verglichen mit der Leber, wenige Untersuchungen vor [42;48;62;68;74;110;149;200]. Dieser Umstand begründet sich in dem verhältnismäßig geringen Gehalt an biotransformatorisch aktiven Enzymen und daraus resultierender technischer Schwierigkeiten bei der Isolierung und Detektion ausreichend reaktiver Enzymsysteme [57;85;149;159;163]. Bisher wurde die Präsenz der Cytochrome 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B1, 2B2, 2B6, 2E1, 3A4 und 3A5 in humanen Keratinozyten nachgewiesen [18;42;46-48;51;74;99;110;166;200;207]. Eines der am besten untersuchten extrahepatischen Cytochrome stellt CYP1A1 dar. Sowohl CYP1A1 und auch CYP1B1, die eine starke Induzierbarkeit durch Umweltschadstoffe wie Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe zeigen, werden Mitwirkungen innerhalb prokarzinogener Biotransformationsprozesse in Verbindung mit einer gesteigerten Inzidenz für Krebserkrankungen zugeschrieben [9;51;93;99;184;200]. Demgegenüber findet man über die Präsenz und Funktion anderer Cytochrome in der Haut weniger Studien [12;68;74]. Weitere Fragestellungen umfassen Studien zur Biotransformation dermal bzw. transdermal wirkender Schadstoffe oder topisch applizierter Arzneimittel unter Berücksichtigung des Einflusses der ultravioletten Strahlung auf diese Stoffwechselfvorgänge [9;200]. Fremdstoffmetabolische Untersuchungen zum Expressionsmuster kutaner Cytochrome verfolgen daher das Ziel, sie als mögliche Targetstrukturen für Xenobiotika einzustufen, Aussagen zu Wirkungen und Nebenwirkungen topisch applizierter Arzneistoffe abzuleiten und Strategien dermatotherapeutischer Medikationen zu verbessern [51].

Den wichtigsten Zelltyp der Haut bilden die Keratinozyten, die mit einem Anteil von 90 % die Hauptpopulation aller Zellen innerhalb der Epidermis ausmachen und somit für die Forschung von besonderem Interesse sind [48;51;159]. Die Studien direkt an Maus- oder Rattenhaut werden angesichts der Tierversuchsproblematik in verstärktem Maße durch in vitro- Methoden, wie Zellkulturen oder isolierten subzellulären Strukturen ersetzt [41;61;151;197]. Dabei rücken besonders Untersuchungen an kontinuierlichen Keratinozytenzelllinien mit hoher Proliferationsrate in den Mittelpunkt der Forschungen [41;42;48;61;67;197]. Ihre Vorteile bestehen in der Bereitstellung einer großen Menge an standardisiertem, reproduzierbarem und homogenem Untersuchungsmaterial und der Möglichkeit zur Charakterisierung von Wirkmechanismen unter kontrollierten Bedingungen und unter Ausschluss systemischer Einflüsse [51;109]. Studien an humanen Keratinozyten besitzen zudem im Vergleich zur Arbeit mit tierischen Zellen eine bessere Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in

vivo- Bedingungen in der menschlichen Haut [51;85]. Der Nachteil gegenüber in vivo- Verhältnissen bzw. Primärkulturen besteht bei der Arbeit mit kontinuierlichen Zelllinien häufig in dem mit zunehmenden Alter der Kultur einhergehenden Nachlassen der Differenzierungskapazität und den Verlusten an enzymatischer Aktivität [61]. Die zusätzlich fehlende Erfassung komplexer Regulationsvorgänge im Gesamtorganismus grenzt somit ihre uneingeschränkte Nutzung als Alternative zu Versuchstierstudien ein, trägt jedoch wesentlich zur Vertiefung des Wissensstandes über fremdstoffmetabolische Umsetzungen bei [51;109].

Im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit soll die immortalisierte, humane, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie HaCaT stehen, die häufig als Ersatz für native humane Keratinozyten dient. Diese spontan transformierte, epitheliale Zelllinie, die in Kultur ihr Proliferationspotential und ihre biochemische Leistungsfähigkeit weitgehend behält, verfügt im Gegensatz zu anderen immortalisierten Zelllinien über annähernd gleiche Differenzierungseigenschaften wie humane Keratinozyten. Sie entstammt der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62jährigen Patienten und konnte Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. etabliert werden. Die Zelllinie HaCaT wurde bisher für vielfältige Fragestellungen genutzt und damit weiter charakterisiert, es gibt auch einige wenige Untersuchungen hinsichtlich der biotransformatorischen Kapazität [12;42;47;48;110;200;207].

## 2 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur weiteren Erforschung der Cytochrom P450- abhängigen Enzymaktivitäten in HaCaT- Keratinozyten leisten. Dabei war es wichtig, ein Testsystem zu etablieren, mit dem im Idealfall einzelne Cytochrom P450-Isoenzyme erfasst werden können. Daneben sollte eine Methodik festgelegt werden, die es ermöglicht, Testsubstanzen hinsichtlich ihrer akuten Toxizität gegenüber Keratinozyten zu charakterisieren. Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mit so genannten Enzymvermittelten Indikatorreaktionen, die im Idealfall die Aktivität eines einzelnen Enzyms repräsentieren. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung der Subfamilie CYP1A/1B, des für den Arzneistoff- Metabolismus besonders relevanten Enzyms CYP 3A4 und der Subfamilie 4A. Es wurden folgende Reaktionen ausgewählt: 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD); 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD); Testosteron- Metabolisierung und 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB).
- 2) Es wurde die Beeinflussung der Metabolisierung der Substrate aus 1) unter dem Einfluss von mehr oder weniger spezifischen Induktoren und Inhibitoren untersucht.
- 3) Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine UVA- oder UVB- Bestrahlung der Zellkultur vor der Bestimmung der enzymatischen Aktivität Einfluss auf die metabolischen Prozesse hat.
- 4) Es wurden Studien zur membranschädigenden Wirkung der Testsubstanzen mit dem Neutralrot- Test durchgeführt und schwerwiegendere Schädigungen der HaCaT- Zellen mit dem MTT- Test erfasst.

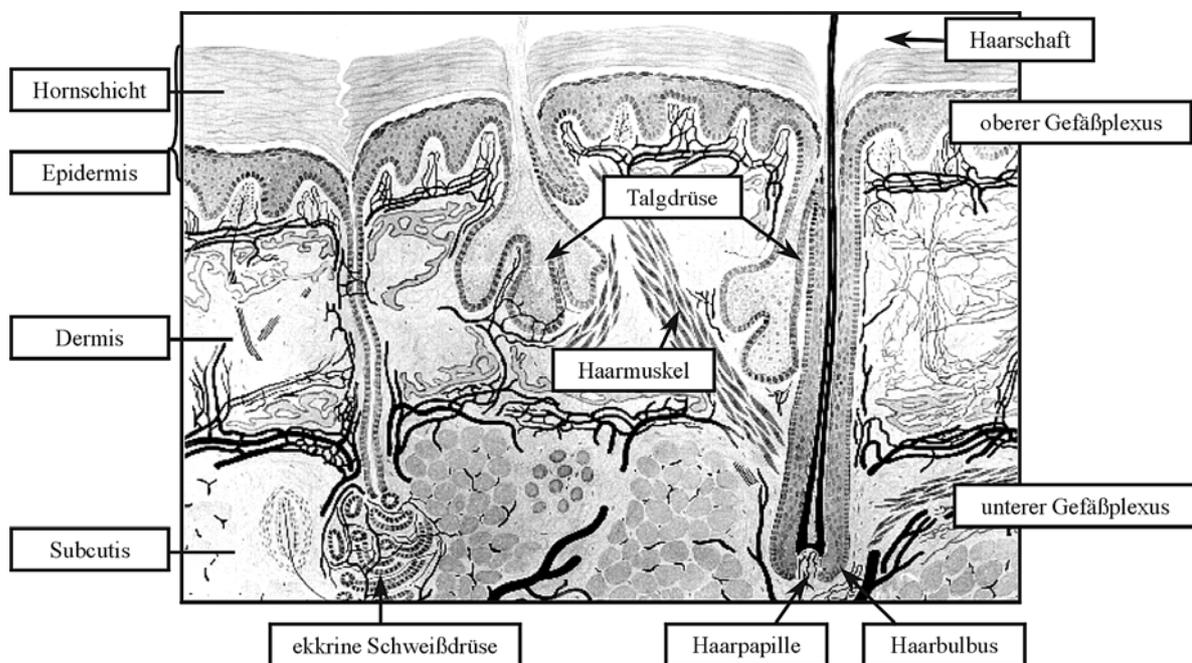
### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Funktion und Aufbau der menschlichen Haut

Mit einer Ausdehnung von 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> bei einem Erwachsenen und einem Anteil am Körpergewicht von 7 bis 10% stellt sie das Kontaktorgan zwischen Umwelt und Organismus dar. Die Haut nimmt dabei folgende wesentliche Funktionen wahr (nach [143]):

- Als Sinnesorgan dient sie der Wahrnehmung von Schmerz-, Tast- und Temperaturreizen.
- Sie übernimmt Barriere- und Reservoirfunktionen, d.h. der Wasserhaushalt wird reguliert, eine Austrocknung verhindert. Gleichzeitig bietet die Haut Schutz vor dem Eindringen von exogenen Substanzen.
- Die Haut erfüllt grundsätzliche Schutzfunktionen, sie bildet einen mechanischen Schutz, sie schützt den Organismus vor Infektionen, vor Licht und ist mit an der Regulation der Temperatur beteiligt.
- Des Weiteren erfüllt die Haut immunologische Aufgaben und stellt eines der Sekretionsorgane des Menschen dar

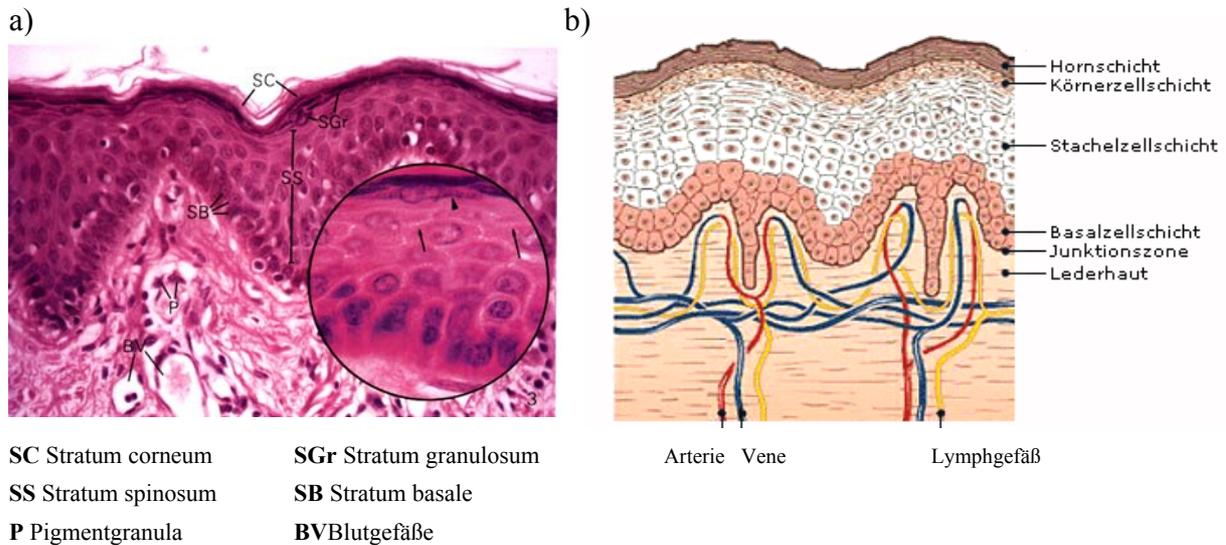
Den vielfältigen Funktionen der Haut entspricht ihr anatomischer Aufbau in verschiedenen Schichten. Sie gliedert sich in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). In der Abb. 3.1.1 ist der Aufbau der humanen Haut schematisch dargestellt.



**Abb. 3.1.1:** Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach [143])

Die EPIDERMIS ist ebenfalls in horizontalen Schichten angeordnet. Man unterscheidet hier zwischen dem an die Dermis angrenzenden Stratum basale (Basalzellschicht), dem darauf folgenden Stratum spinosum (Stachelzellschicht), sowie dem Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und dem abschließenden Stratum corneum (Hornschicht). Die nachfolgenden Abbil-

dungen 3.1.2 a) und b) zeigen einen histologischen Querschnitt und eine schematische Darstellung insbesondere der Epidermis.



**Abb. 3.1.2:** Aufbau der menschlichen Epidermis

a) histologischer Querschnitt (Vergrößerung 320-fach, Ausschnitt 640-fach) [168]

b) schematische Darstellung der Kutis (modifiziert nach [4])

Mit ca. 90% sind die Keratinozyten die vorherrschende Zellpopulation in der Epidermis. Unter Normalbedingungen werden die Keratinozyten im Stratum basale gebildet und gelangen im Laufe ihrer Differenzierung durch die anderen Schichten an Hautoberfläche und werden dort als Hornzellen abgeschilfert. Die Bildung der Keratinozyten erfolgt in der tiefsten Schicht der Epidermis, der Basalzellschicht, unter Zellteilung, dabei bleibt zumeist eine Tochterzelle im Verband des Stratum basale, die andere Tochterzelle gelangt (häufig nach weiterer Teilung) als Stachelzelle in das Stratum spinosum. Hier nehmen die Keratinozyten an Volumen zu und flachen ab. Im Stratum granulosum werden die Vorstufen des Keratins der Hornschicht gebildet, es beginnt die Verhornung und das Absterben der Zellen durch zunehmende Degeneration der Zellkerne. In der Hornschicht liegt der ehemalige Keratinozyt als kernlose, voll keratinisierte Zelle vor, die nunmehr als Korneozyt bezeichnet wird. In einem gesunden Organismus dauert dieser Prozess, man bezeichnet ihn auch als epidermale Differenzierung oder Enddifferenzierung, durchschnittlich 28 bis 30 Tage.

Die Vorbereitung der Differenzierung der Keratinozyten beginnt bereits im Stratum basale mit der Synthese von Zytokeratinen. Auf dem Weg durch die Epidermis entstehen Keratinfilamente, welche im oberen Stratum spinosum mit Profilaggrin Aggregate bilden, die im Stratum granulosum sichtbar werden. Durch den Zerfall des Profilaggrin entsteht Filaggrin, das die Vernetzung der Keratinfilamente zu Keratin abschließt. Im oberen Stratum spinosum erfolgt die Synthese einer Reihe von Proteinen, darunter das Involucrin, die sich an die innere Zellmembran der Keratinozyten im Stratum granulosum anlagern. Beim Übergang zum Korneozyt entsteht unter Einwirkung von Transglutaminasen eine quer vernetzte Hüllmembran

mit hoher chemischer Resistenz, sie wird auch als „cornified envelope“ bezeichnet. Aus diesem Grund werden hauptsächlich Profilaggrin, Filaggrin, unterschiedliche Keratine und Involucrin als Marker genutzt, um Aussagen zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum von Keratinozyten machen zu können. [26;29;30;94;98;137;143;179;188]

Innerhalb der Zelle kommt den Cytochrom P450- Enzymen für biotransformatorische Prozesse eine besondere Bedeutung zu. In Säugetieren sind diese CYP- Enzyme membranständig im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (EndR) und der Mitochondrien lokalisiert. Man unterscheidet zwischen dem rauhen EndR (granuläres, rough) mit Ribosomenbesatz und dem glatten EndR (agranuläres, smooth). Das raue EndR wird besonders in Zellen intensiver Proteinsynthese exprimiert. Hier dient es der Synthese und dem Transport dieser Proteine. Das glatte EndR, das nicht von Ribosomen besetzt wird, findet sich besonders in Zellen, die Lipide, Phospholipide, Fettsäuren oder Steroidhormone produzieren, auf- oder abbauen. Im glatten EndR sind auch die gebundenen Enzyme des Cytochrom P-450 lokalisiert. Bei vermehrter Proteinsynthese und zunehmender metabolischer Aktivität nimmt der Anteil an EndR innerhalb der Zelle zu [103;194]

### **3.2 UV-Strahlung und deren Einfluss auf die Haut**

Aufgrund ihrer großen Kontaktfläche zur Umwelt ist die Haut der UV- Strahlung besonders intensiv ausgesetzt. Bei der UV- Strahlung handelt es sich um elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm. Diese wird nochmals unterteilt in die Bereiche UVC (200 – 280 nm); UVB (280 – 320 nm) und UVA (320 – 400 nm), wobei gilt, je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher die Strahlung. Mitunter wird die Grenze zwischen UVA und UVB mit 315 nm angegeben. Während die UVC Strahlung vom Sauerstoff in der Atmosphäre und von der Ozonschicht in der Stratosphäre nahezu vollständig absorbiert wird, erreicht die UVA- Strahlung und der überwiegende Teil der UVB Strahlung die Erdoberfläche und ist somit für die menschliche Haut von Belang. Ein großer Teil der auf der Haut auftreffenden UV-Strahlung wird reflektiert, diffus gestreut oder im Stratum corneum absorbiert (ca. 90% der einfallenden UVB- und 60% der UVA- Strahlung). Daneben kann ein erheblicher Teil in Abhängigkeit von der Wellenlänge in unterschiedliche Hautschichttiefen eindringen. In Abhängigkeit von ihrem Energiegehalt wird UVA und UVB- Strahlung unterschiedlich stark von der Haut absorbiert, wodurch die Strahlung abgeschwächt und die Eindringtiefe begrenzt wird. Allgemein nimmt die Eindringtiefe des UV-Lichtes mit zunehmendem Energiegehalt ab, so dass die kurzwellige, energiereiche UVB-Strahlung bis in die Epidermis, die langwelligere, energieärmere UVA- Strahlung hingegen bis in dermales und teilweise subcutanes Gewebe einzudringen vermag.

Die Wirkung, die durch die ultraviolette Strahlung erzielt wird, ist zum Teil erwünscht und lebensnotwendig, andererseits kann es durch zu hohe Strahlen- Belastungen zu teilweise drasti-

schen Schädigungen der Haut kommen. Die UV-Strahlung stimuliert das Immunsystem und fördert das Allgemeinbefinden der Menschen. Bei getrennter Betrachtung der Auswirkungen von UVA und UVB auf den humanen Organismus weiß man, dass UVB-Strahlung in moderaten Dosen z.B. für die Synthese von Vitamin D verantwortlich ist, ein wichtiger Schritt, damit es nicht zu Rachitis, einer Vitamin-D-Mangelkrankheit, kommt. Durch UVB werden auch die Melanozyten stimuliert.

Da Licht der UVB- Wellenlänge in die Epidermis gelangt, können bereits bei einer physiologischen Lichtexposition pathologische Hautreaktionen auftreten. Das klinische Bild zeigt sich besonders bei Überschreiten der minimalen Erythemdosis in Form von Rötung, Erythem- und Blasenbildung. Es kann zu nekrotischen Veränderungen mit dem Absterben von Zellen kommen. Es ist auch möglich, dass die Keratinozyten bis ins Stratum basale geschädigt werden und nicht nur deren Teilungsfähigkeit eingeschränkt wird, sondern es zu Veränderungen an der Erbsubstanz kommt. Hier sind vor allem die Bildung stabiler Dimere aus nicht komplementären Basen oder DNA- Strangbrüche zu nennen. In der Regel werden solche Schäden durch körpereigene Reparatursysteme, zu denen z.B. der programmierte Zelltod (Apoptose) gehört, beseitigt. Ist dieses System überfordert oder ist die Reparatur nicht komplett, resultieren Mutationen, die in der Spätfolge zu Hautkrebs führen können. Einige Zellen, z.B. Melanozyten, sind auch in der Lage, Proteine zu produzieren, durch die die körpereigenen Reparatursysteme unterlaufen werden, wodurch Zellen mit mutierter DNA überleben.

UVA- Strahlen bewirken bei chronischer Einwirkung eine vorzeitige Hautalterung, durch Zerstörung von Kollagenfasern in der Dermis. Daneben ist Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von Bedeutung. Diese sehr kurzlebigen aber hoch reaktiven Sauerstoffabkömmlinge besitzen ein großes Potential, der Haut oxidative Schäden zuzufügen. Dies kann sowohl die DNA, als auch Proteine und Lipide betreffen, in der Folge sind DNA- Basenmodifikationen oder Lipidperoxidationen möglich. Während die Eindringtiefe der UVB- Strahlung meist auf die Epidermis begrenzt ist, muss für die UVA- Strahlung mit entsprechenden Schäden auch in tieferen Hautschichten gerechnet werden. [9;51;63;89;144;158;213]

### **3.3 Die HaCaT- Keratinozyten- Zelllinie**

Die Abkürzung HaCaT steht für *Human adult low Calcium high Temperature* keratinocytes. Der Name charakterisiert die Herkunft der Zellen und die Bedingungen bei der Etablierung der Zelllinie. Es handelt sich um eine permanente, epitheliale humane Zelllinie, die als phänotypisch spontan transformiert, aber nicht tumorigen eingestuft wird. Sie entstammt der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62jährigen Patienten. Etabliert und in vielfältiger Hinsicht charakterisiert wurde die HaCaT- Zelllinie Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. [26;41;112;197]. Für HaCaT- Zellen ist es charakteristisch,

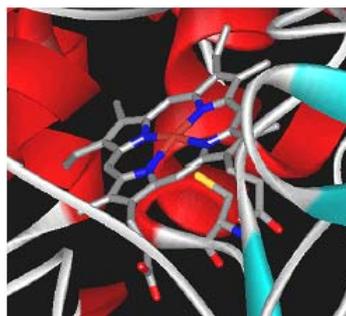
dass sie ihre volle terminale Differenzierungsfähigkeit in Korneozyten behalten. Eine wichtige Rolle spielt der Calciumgehalt. Wenn der Calciumgehalt von niedrig (0,09 mM [106] bzw. 0,15 mM [48]) auf hoch (1.5 mM [48] bzw. 2.0 mM [106]) (= physiologisch) steigt, so steigt auch die Differenzierungsrate. Dies bedeutet, hohe Ca- Konzentrationen im physiologischen Bereich (> 1,0 mM) führen verstärkt zu einer terminalen Differenzierung und Stratifizierung, wohingegen niedrige Konzentrationen (< 0,1 mM), die Bildung eines adhärenen Monolayers proliferierender Keratinozyten begünstigen [154;155;198].

Für die breite Verwendung der HaCaT- Zellen erwies sich die hohe Immortalität (>140 Passagen möglich) als besonders günstig. In einer Vielzahl von Studien zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften von HaCaT und nativen Keratinozyten konnten Gemeinsamkeiten im biochemischen Verhalten, jedoch auch Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit aufgezeigt werden [76;180]. HaCaT- Zellen bilden, ebenso wie NHK (Normal adult Human Keratinocytes = native Keratinozyten), einen Monolayer und zeigen die gleiche phänotypische Morphologie. Es wurden Vergleiche in der Zelladhäsion, den Zellinteraktionen und in der Reaktion auf zytotoxische Ereignisse gefunden [28]. Auch Tests, inwiefern Keratinozyten eine Rolle bei der frühen Immunantwort auf sensibilisierende Agenzien bei der Ausbildung einer allergischen Kontaktdermatitis spielen, wurden mit NHK und HaCaT durchgeführt [117]. Ebenso liegen Daten für den Einsatz von HaCaT, teilweise im Vergleich zu NHK, zur Ermittlung von Toxizitäten vor [17;28;31;46;56]. Für den Einsatz in Studien mit UV-Bestrahlung lieferten HaCaT- Zellen bereits vielfältige Daten [64;71;152;200]. Allerdings wurde nur in einer Studie die biotransformatorische Kapazität zwischen NHK und HaCaT, neben einer weiteren Zelllinie (SVK14), verglichen. Dabei wurden die 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase (ECOD)-, die 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)- und die Pentoxyresorufin-O-Dealkylase (PROD)-Aktivität im Zusammenhang mit der Induktion per 3- Methylcholanthren (3-MC) und der Hemmung per Proadifen untersucht. Für die beiden ersten Reaktionen konnte der Nachweis in HaCaT- Zellen erbracht werden, die PROD- Aktivität ließ sich nicht belegen. [42]

### 3.4 Das Cytochrom P450 – Enzymsystem

Cytochrome sind Proteine, die u.a. in der Atmungskette des tierischen und menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen, auch in Pflanzen und Mikroorganismen kommen sie vor. Dort sind sie an der Lichtreaktion in den Chloroplasten beteiligt. Die Bezeichnung Cytochrom P450 beruht auf der starken Absorption von Licht der Wellenlänge 450nm nach Reduktion mit Natriumdithionit und Equilibrierung mit Kohlenmonoxid [137]. Bei Cytochrom P450 handelt es sich um die wohl vielfältigste, an metabolischen Reaktionen beteiligte Monooxygenase, die aber auch an anderen Reaktionen, wie Reduktionen beteiligt ist. Im Körper mitverantwortlich für Biotransformationsreaktionen, Hormonbiosynthesen, die Detoxifikation von toxischen Stoffen, spielt das CYP-450 aber auch umgekehrt für die Entstehung toxischer

bis cancerogener Verbindungen aus ehemals unbedenklichen Substanzen eine Rolle [169].



**Abb. 3.4.1:** Computer- modelliertes Bild mit Blick auf die prosthetische Gruppe des CYP-450 - das Häm aus [53]

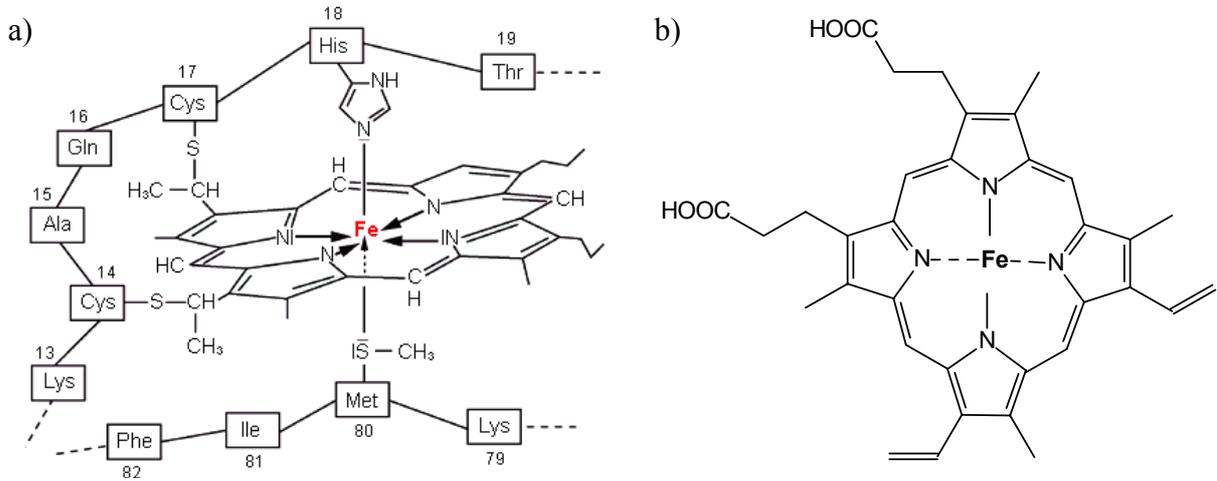
Die Untersuchungen zu CYP 450 begannen in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Neben einer Vielzahl von Wissenschaftlern, die sich um die Entdeckung und Mechanismen sowie Induktionsmöglichkeiten und den Nachweis von Spezies- bzw. Geschlechtsunterschiede verdient gemacht haben, werden vor allem die Namen von Omura, T. und Sato, R. mit dem Cytochrom P450 in Verbindung gebracht, die Namensgeber dieses Enzymkomplexes. Verschiedenste Cytochrom P450 Isoenzyme wurden inzwischen in Mensch, Säugetieren, Vögeln, Fischen, Insekten, Pflanzen, Bakterien und Pilzen nachgewiesen [2]. Dabei erstreckt sich deren Verteilung auf nahezu alle Organe und Gewebe mit dem Schwerpunkt an fremdstoffmetabolischer Aktivität in der Leber [22;114].

Erstmals veröffentlichten Nebert et al. 1989 eine Liste von CYP 450- Enzymen mit ihrer Sequenz und Aktivität, der 1991 eine zweite Liste folgte. Diese Liste umfasste 154 Gene, die 27 Genfamilien zuzuordnen waren incl. 10 Familien für Säugetiere [138;139]. Durch die Arbeiten von Nelson et al. und weiteren Arbeitsgruppen konnten bis April 2007 insgesamt 6766 CYP- Gene und 708 Genfamilien identifiziert werden, von denen 101 CYP- Familien auf Tiere entfallen, humane Gene sind gegenwärtig 57 bekannt [6;114;140;141]. In einer Studie von Nelson wurde das komplette CYP- Genmaterial von Maus und Mensch auf genetische Ähnlichkeit und Unterschiede untersucht, um Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der an Mäusen gewonnenen Daten auf den Menschen ziehen zu können [142]. Da die Forschung auf diesem Gebiet ständig weiter geht, stellen Nelson et al., eine auf diesem Fachgebiet derzeit führenden Arbeitsgruppen, neueste Erkenntnisse aktuell im Internet vor [6]. Die auf Nebert zurückgehende Bezeichnung einzelner Cytochrom- Enzyme ergibt sich heute wie folgt:

**CYP = Hämthiolatprotein; I = Familie; A = Subfamilie; I = individuelles Enzym ► CYP1A1**

Dabei zeichnen sich die Mitglieder einer Familie durch eine mindestens 40%ige Aminosäuresequenzidentität aus. Eine Subfamilie ist laut Nelson [141] durch eine 55%ige Sequenzidentität gekennzeichnet, Ruckpaul [169] beschreibt sie mit 59%iger Identität und Borchert spricht von über 70%iger Homologie der Primärstruktur für eine Subfamilie [22]. Zur Nomenklatur humaner Cytochrom P450- Allele sei an dieser Stelle auf die Internetseite [www.imm.ki.se](http://www.imm.ki.se) verwiesen [5], dort finden sich, neben den Unterschieden in der Nukleotidsequenz einzelner

Enzyme, Aussagen zu deren Aktivität und eine umfangreiche Referenzliste. Auf der Seite [www. icgeb.org](http://www.icgeb.org) [1] kann man zusätzlich eine sehr umfassende bibliographische Liste zu den Untersuchungen einzelner CYP- Isoenzyme bis 1993 finden.

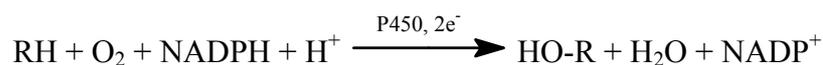


**Abb. 3.4.2:** Cytochrom- Strukturen:

a) Cytochrom c [3]

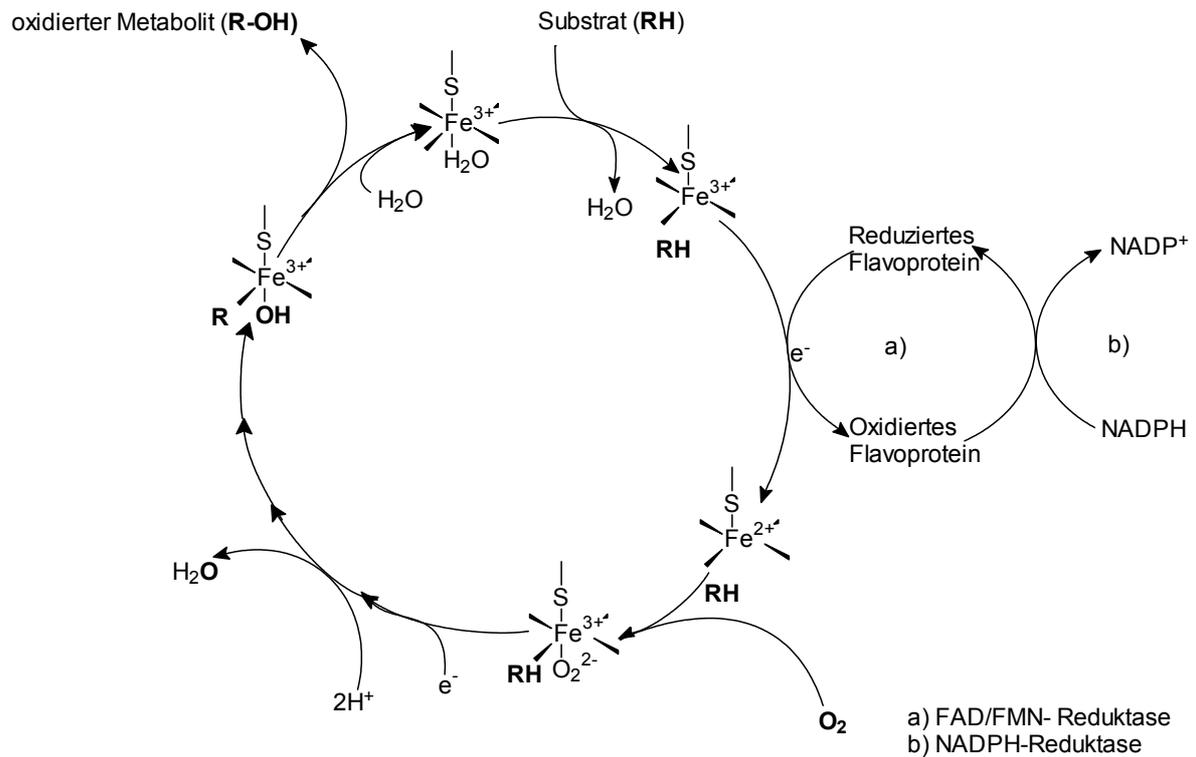
b) prosthetische Gruppe des CYP 450 nach [214]

Die Abbildung 3.4.2 a) zeigt einen Ausschnitt des Cytochrom c, einem Protein der Atmungskette, darin wird andeutungsweise die räumliche Struktur des Porphyrin- Ringsystems sichtbar, auch gut erkennbar ist das Eisen als Zentralatom mit seinen vier Pyrrol- Stickstoff- Liganden und die zweimalige koordinative Bindung des Porphyrin zum Schwefel der Cysteine der Seitenkette. Den 5. Liganden bildet hier ein Schwefelatom aus dem Methionin der Seitenkette. Im CYP 450, das dem Cytochrom b zugeordnet wird, entstammt dieser 5. Hämeisenligand einem Cysteinrest, den man aufgrund der Bindung über den Schwefel auch als Mercaptidschwefelliganden bezeichnet. Er ist für die katalytischen und spektralen Eigenschaften des P-450 verantwortlich [22]. Die Formel in der Abbildung 3.4.2 b) stellt die prosthetische Gruppe des CYP 450, das Häm, dar. Im Ruhezustand wird die 6. Koordinationstelle des P-450 durch ein Wassermolekül besetzt. Erst mit der Bindung eines Substratmoleküls wird dieser 6. Ligand verdrängt und die eigentliche Umsetzung entsprechend dem Schema in Abb. 3.4.3 beginnt [22]. Alle CYP- Hämthiolatproteine zeichnen sich grundsätzlich durch das gleiche Reaktionsprinzip aus, sie binden molekularen Sauerstoff, spalten diesen reduktiv und überführen ein Atom Sauerstoff auf das Substrat. Das zweite Sauerstoffatom wird in Form von Wasser freigesetzt. Formal lässt sich dies vereinfacht in einer Gleichung darstellen:



Aus dem Substrat RH wurde der hydrophilere Metabolit R-OH, der in der Folge durch Phase-II- Reaktionen weiter an Hydrophilie zunimmt, womit dessen Ausscheidbarkeit aus dem Organismus erleichtert wird.

Das Schema der P-450 Monooxygenasereaktion lässt sich vereinfacht wie in der folgenden Abbildung wiedergeben (die Darstellung erfolgte angelehnt an [22;93;114;169;214]).



**Abb. 3.4.3:** Schema der P450 Monooxygenasereaktion

Beginnend mit der Anlagerung des Substrates wird das Wasser als 6. Eisen- Ligand verdrängt. Ein durch die NADPH- Reduktase bereitgestelltes Elektron wird auf das P450 übertragen, es resultiert ein Fe(II)-Komplex. Dieser ist in der Lage das Sauerstoffmolekül zu binden, woraus ein oxygeniertes Intermediat entsteht (auch als "Superoxokomplex" oder "Superoxidanion" bezeichnet). Unter Aufnahme eines weiteren Elektrons und Ausbildung einer Peroxozwischenstufe wird in Gegenwart von Protonen Wasser eliminiert. Über weitere Intermediate wird letztlich das oxygenierte Substratmolekül abgespalten, so dass nach Anlagerung von Wasser das CYP-450 zur erneuten Substrataufnahme bereit steht. (Es sind nur die wesentlichen Schritte graphisch dargestellt.)

S stellt den 5. Hämeisenliganden, den Mercaptidschwefelliganden dar. RH ist das Substrat und ROH das oxygenierte Produkt.

Von den vielen bislang entdeckten CYP 450- Enzymen spielen für die Biotransformation im menschlichen Organismus einige wenige eine überragende Rolle. Zu den Hauptenzymen der humanen Leber, dem Organ mit der größten metabolischen Aktivität, zählen 3A4, 2E1, 2C9, 1A2 und 2D6 mit einem Anteil von zusammen über 90% [22]. Es sind alle P450- Enzyme in Säugetieren membranständig, hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (EndR) und nur zu einem geringen Anteil in den Membranen von Mitochondrien zu finden. Bei Ruckpaul findet sich eine Abbildung, die die Komponenten für den Elektronentransport in den Membranen des EndR veranschaulicht [169].

### 3.4.1 Die Familie CYP 1

Die Familie CYP1 spielt für den Organismus eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung besonders schädlicher, kanzerogener Substanzen. Es sind hier vor allem die Isoenzyme CYP1A1 und 1A2 charakteristisch. Daneben gibt es noch CYP1B1, das dem 1A1 funktionell näher steht als dem 1A2, allerdings gibt es zu 1B1 längst nicht so viele Studien wie zu den beiden anderen Enzymen [11;164;183;184]. In der menschlichen Haut konnte CYP1B1 bereits nachgewiesen werden [9] auch unter dem Einfluss von UVB-Strahlung [99]. Bei Villard et al. war das 1B1 Gegenstand der Untersuchung an HaCaT- Zellen unter UVB- Bestrahlung [200].

Die Enzyme CYP1A1 und vor allem 1A2 erwiesen sich in Kombination mit Phase-II-Reaktionen als bedeutsam für Metabolisierungen aufgrund von genetischen Unterschieden, sowohl innerhalb einer Bevölkerungsgruppe, als auch zwischen dem asiatischen und kaukasischen Typ (darunter ist die weiße Bevölkerung zu verstehen). Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich, potentielle Risiken für individuelle Arzneimitteltoxizitäten. Man spricht auch von pharmakogenetischem Polymorphismus, wegen dessen medizinischer Bedeutung wurde und wird vielfältig besonders an der Leber, aber auch an anderen Organen geforscht. Dadurch existiert inzwischen eine Vielzahl von Untersuchungen mit Vergleichen zwischen dem Verhalten an menschlichen Leberzellen und extrahepatischem Gewebe [80;81;112;127;131;176;192].

Es wurden für beide Enzyme gleiche bzw. nahezu gleiche Kodierungssequenzen sowohl in Menschen, Hunden, Hasen, Mäusen, Ratten und Hamstern gefunden. Die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz beider Enzyme liegt je nach Spezies zwischen 67,6% (Maus), 71,7% (Mensch) und 73,6% (Hund). Die prozentuale Ähnlichkeit (Homologie) der Aminosäuresequenz zwischen Tier und Mensch gestaltet sich wie folgt [93]:

CYP 1A1: Affe-94,1%; Hund-81,2%; Maus-79,4%; Ratte-78,6%; Regenbogenforelle-56%

CYP 1A2: Hund-81,3%; Hase-77,5%; Ratte-74,4%; Maus-72,1%

Beide CYP1A- Enzyme sind induzierbar durch 3-MC,  $\beta$ -NP und andere Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (z.B. enthalten im Tabakrauch) sowie durch TCDD. Für 1A2 spielt außerdem Isosafrol als Induktor eine Rolle. Als Inhibitor kommt vor allem  $\alpha$ - NP in Betracht [114] (weitere Ausführungen im Kapitel 3.4.5).

Während CYP1A1 in vielen Geweben des Menschen exprimiert wird, wie z.B. in Lunge, Niere, Plazenta und Haut, beschränkt sich der Nachweis von CYP1A2 hauptsächlich auf die Leber, wo es einen Anteil von ca. 5% an den gesamten CYP- Enzymumsetzungen hat [22;93]. Die Substratspezifität des 1A1 erstreckt sich hauptsächlich auf Umsetzungen von polyzyklischen Aromaten. Dagegen ist 1A2 an der Metabolisierung von einer Reihe medizinisch relevanter Substrate beteiligt, wie den Umsetzungen von Verapamil und Coffein [38] oder der O-Deethylierung von Phenacetin, die auch als Modellreaktion zur Charakterisierung des Isoenzym 1A2 herangezogen wird [85;126;130;145;182;202]. Weitere Modellreaktionen, die die Enzyme 1A1/ 1A2 charakterisieren sind die EROD und die Coffein-N-Demethylation [147].

### 3.4.2 Die Familie CYP 2

Für menschliches Gewebe sind die Nachweise der Cytochrome 2A6, 2A7, 2B6 und 2B7, sechs verschiedener 2C- Gene, des CYP 2D6 und des CYP 2E1 beschrieben [178]. Von großer Bedeutung scheint dabei das an der Coumarin-7-Hydroxylierung beteiligte CYP 2A6 zu sein, eine Reaktion, die häufig als Modellreaktion dient [147]. Dieses Enzym ist auch an der 7-Ethoxycoumarin-O- Deethylierung beteiligt. Das CYP2A7 ist weniger untersucht, mit einer 96%igen Ähnlichkeit in der Nucleotidsequenz zu CYP2A6 steht es diesem recht nah. Die Coumarin-7-Hydroxylierung und die 7-ECOD wurden für CYP2A7 nicht nachgewiesen. [93] Bei Ioannides, C. [93], ist in einer Zusammenfassung vieler Studien der Nachweis von Enzymen der CYP2B-Subfamilie für menschliches Gewebe als schwer detektierbar beschrieben es scheint zwar einigen Autoren gelungen zu sein, jedoch am Rande der Nachweisgrenzen.

Aus der CYP 2C- Subfamilie wird, neben CYP2C8, C18, C19 vor allem das CYP 2C9 häufig im Zusammenhang mit Arzneistoffbedingten Wechsel- und Nebenwirkungen genannt. Das entsprechende Gen wird für den S-Mephenytoin- Polymorphismus verantwortlich gemacht, der 2-5% der Kaukasier und bis zu 23% der Asiaten betrifft. Das Enzym ist beispielsweise an der Umsetzung von Warfarin, Phenytoin und der Epoxidation von Arachidonsäure beteiligt. [93;178]

Bei der CYP 2D- Subfamilie ist vor allem 2D6 für den Mensch von Bedeutung, da auch dieses Gen einem Polymorphismus unterliegt. 7 bis 8% der Kaukasier besitzen ein Mutation in diesem Gen und sind daher nicht in der Lage, z.B. Spartein und über 20 weitere Substanzen umzusetzen. Die Ausstattung mit CYP 2D6 wird auch im Zusammenhang mit dem Lungenkrebsrisiko von Rauchern diskutiert. Als Modellreaktion zur Charakterisierung des 2D6 wird vielfach die Dextromethorphan-**O**-Demethylierung herangezogen [145;147],

Bei der CYP 2E- Subfamilie spielt für den Menschen nur das 2E1 eine Rolle, so ist dieses Gen an der Metabolisierung von niedermolekularen Lösungsmitteln beteiligt. Aus dem Bereich der Arzneimittel stellt z.B. Chlorzoxazon ein CYP2E1- Substrat dar, auch Nitrosamine sowie Nitroso- und Azoverbindungen können durch 2E1 umgesetzt werden [93;147]. Aufgrund der Substrate von 2E1 wird es oft im Kontext mit dem Auftreten von Leberschäden, insbesondere nach Alkoholeinwirkung genannt. Es scheint generell an Reaktionen beteiligt zu sein, die zu einer erhöhten Toxizität der Produkte führen. [178] Für menschliches Gewebe wurde eine Beteiligung von CYP2E1 an der 7-ECOD beschrieben [206].

### 3.4.3 Die Familie CYP 3

Mit Abstand die größte Bedeutung für den Arzneistoffwechsel besitzt das wohl am meisten untersuchte Isoenzym dieser Familie, das CYP3A4. Daneben spielen in humanem Gewebe noch die Enzyme 3A3, 3A5, 3A7 eine Rolle. Die ebenfalls oft charakterisierten Enzyme 3A1 und 3A2 konnten hauptsächlich in Untersuchungen an Ratten gewonnen werden [205]. Weitere Subfamilien wurden in menschlichem Gewebe bislang nicht nachgewiesen. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zwischen 3A3 und 3A4 liegt bei 98%, aus diesem Grund ist noch

nicht völlig geklärt, ob es sich wirklich um zwei verschiedene Gene oder nur Allelvarianten eines Gens handelt. Während 3A4 das vorherrschende Enzym in der adulten menschlichen Leber ist, konnte 3A3, wenn überhaupt, nur in äußerst geringen Mengen in humanem hepatischem Gewebe nachgewiesen werden. Außer der Leber kommt 3A4 noch im Gewebe des Verdauungstraktes vor, wie dem Zwölffingerdarm, dem Dünn- und Dickdarm, dem Magen, der Speiseröhre und im Dickdarm. [123]

CYP3A5 wurde sowohl in der Leber von Erwachsenen als auch von Kindern gefunden, ebenso wie in beider Nierengewebe. Das Vorhandensein in menschlichem Lungen- und Magengewebe wurde ebenfalls belegt [104;161]. Dagegen handelt es sich bei 3A7 um ein CYP-Enzym, das ausschließlich in der fötalen Leber und Niere gefunden wurde. Nach der Geburt und mit fortschreitender Entwicklung lässt die Expressierung dieses CYP- Enzyms nach und das CYP3A4 wird zum Hauptisoenzym in der menschlichen Leber, welches in Föten noch nicht nachweisbar ist [107;123]. Ein Nachweis von CYP3A7 in einer humanen Keratinozytenzellkultur von Erwachsenen konnte nicht erbracht werden, genauso wenig, wie der Nachweis von 3A4. Die Bestrahlung mit UVA/UVB änderte daran nichts. Dagegen konnte in dieser Untersuchung CYP3A5 ohne Bestrahlung, als auch unter dem UVA- bzw. UVB- Einfluss nachgewiesen werden [74].

Als Modellreaktionen dienen vor allem die Hydroxylierungen von Steroiden insbesondere die des Testosterons. Neben der 6 $\beta$ - Hydroxylaseaktivität spielt beim Nachweis der CYP3A4-Aktivität außerdem die Erythromycin-N-Demethylase eine Rolle [204]. Hinzu kommen die Nifedipinoxidation [193], die Dextromethorphan-N-Demethylierung [97;145] und die Metabolisierung von CiclosporinA [58;199]. Von Maurel, P. gibt es eine Aufstellung mit humanen CYP3A- Substraten, die 44 Reaktionen mit den zugehörigen Referenzen auflistet [123]. Neu hinzugekommen ist die Substanzklasse der Protease- Hemmstoffe [44].

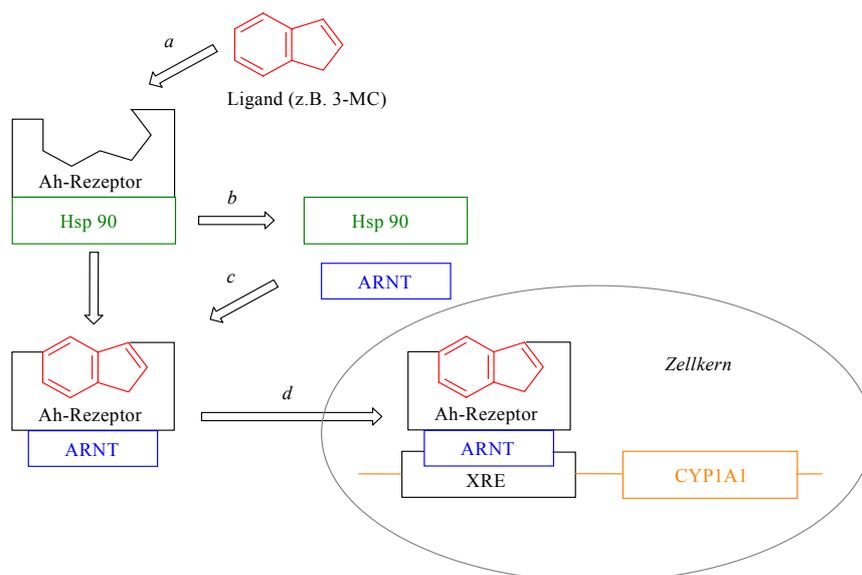
#### **3.4.4 Die Familie CYP 4**

Obwohl bislang elf Subfamilien des CYP4 nachgewiesen wurden (CYP4A bis CYP4M), ist nur die CYP4A- Subfamilie mit ihren 14 Genen sehr ausführlich untersucht wurden. Für humanes Gewebe wurde die Existenz von 4A9, 4A11, 4B1, 4F2 und 4F3 belegt. Dabei konnte für den Mensch der Nachweis von CYP4A in der Leber und der Niere erbracht werden [93;141;185]. Als endogene Substrate von CYP4A im menschlichen Organismus gelten Fettsäuren, Prostaglandine und Leukotriene. Dagegen scheint CYP4A wenig Einfluss auf die Metabolisierung exogener Substanzen zu haben. Die Untersuchung diverser Modellreaktionen (ECOD, EROD und Testosteron- Metabolisierung) an HepG2- Zellen erbrachte keine Aktivität [16], ebenso wenig wie vergleichbare Untersuchungen an Hasen [212]. Auch Untersuchungen an Mikrosomen aus menschlichen Nierenzellen ließen keine Metabolisierung von Xenobiotika erkennen [100]. Unter Verwendung von Induktoren, die die Peroxisomenproliferation steigerten, war eine erhöhte Metabolisierungsrate einiger Stoffe zu beobachten, zudem wurde über eine Erhöhung der Azoreduktase- Aktivität unter Clofibrat berichtet [93;113;162].

### 3.4.5 Induktion und Inhibition

Die INDUKTOREN sind je nach Cytochrom- Familie, teilweise auch nach Subfamilie völlig verschieden, zumindest unterscheiden sie sich in ihrer Affinität zu den einzelnen Enzymen. Zum Teil geht von einem Induktor eine recht spezifische Induktion eines oder nur weniger CYP- Enzyme aus, manchmal werden durch einen Induktor auch gleichzeitig mehrere CYP- Enzyme aus verschiedenen Familien induziert [171]. Prinzipiell teilt man Induktoren in sieben Gruppen ein, u.a. den Methylcholanthren- und den Phenobarbital- Typ. Bei ersterem erfolgt ein Eingriff in die CYP- Synthese bei dem die Proliferation des EndR und damit das Lebergewicht unbeeinflusst bleibt. Induktoren von PB- Typ, zu denen eine ganze Reihe von Arzneistoffen zählen, steigern die Proliferation des EndR und bewirken damit eine Zunahme des Lebergewichtes. Als starke Induktoren dieses Typs sind z.B. die Barbiturate und Hydantoine, Rifampicin und Tolbutamid zu nennen. [137]

Die *Cytochrom 1-Familie* wird besonders spezifisch durch die planaren Moleküle polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe induziert, Vertreter sind beispielsweise Benzo[a]pyren (im Zigarettenrauch enthalten), Benz[a]anthracen,  $\beta$ -Naphthoflavon und 3-MC [171]. Aber auch zahlreiche polychlorierte oder polybromierte Biphenyle und Dibenzop-dioxine, wie besonders TCDD, sind starke Induktoren des CYP1A1/2 [49;65;73;79]. Im Zellinneren werden diese Moleküle an den zytosolischen Ah-Rezeptor ("Aryl hydrocarbon" = Kohlenwasserstoff) gebunden, der wiederum an das Protein hsp90 ("heat-shock-protein") gebunden ist. Aufgrund der Bindung dissoziiert das Hitzeschockprotein ab. Der übrig bleibende Komplex bindet an das ARNT- Protein ("Ah-receptor nuklear translocator") und wandert in aktivierter Form an bestimmte Stellen der Kern- DNA, so genannte "xenobiotic responsive elements", an die er schließlich andockt. Durch diese Aktivierung wird die Transkription der oben erwähnten Enzyme induziert [7;172]. Der Mechanismus des Ablaufs ist in Abb. 3.4.4 angelehnt an andere Autoren graphisch dargestellt [51;93;137].



**Abb. 3.4.4:** Mechanismus der CYP1A1-Induktion durch Aktivierung des Ah- Rezeptors [51]

Die Induktionskapazität einzelner Enzyme unterscheidet sich, ähnlich der Substratspezifität, u.a. dahingehend, in welchem Gewebe die Umsetzung erfolgt. So konnte ein Dioxin-Derivat in der Hasen-Leber CYP1A1 und 1A2 induzieren, dasselbe Derivat vermochte in Lunge und Niere nur CYP1A1 zu induzieren [115]. Die gewebeabhängige Induktionskapazität gestaltet sich wie folgt: Leber > Niere > Lunge > Intestinales Gewebe > Milz > Hoden [73]. Aber nicht nur hinsichtlich der Gewebe gibt es Unterschiede in der Induzierbarkeit, auch Geschlecht, Alter und verschiedene Spezies lieferten differenzierte Ergebnisse für gleiche Induktoren [81;122;127;192]. Als recht selektiver Induktor des CYP1A2 gilt Isosafrol, das in Rattenlebermikrosomen 1A2 induzierte, dagegen kaum Effekte auf CYP1A1 zeigte [173].

Die **Cytochrom 2-Familie** ist nicht durch so klare Strukturen der Induktoren gekennzeichnet, wie CYP1. Vielmehr gibt es hier nicht nur strukturelle Variationen, sondern auch Unterschiede hinsichtlich der Induktoren zwischen den einzelnen Subfamilien. Daneben sind die schon oben genannten Faktoren wie Gewebe, Geschlecht und Spezies von starkem Einfluss. Als Induktoren der CYP2-Familie wurden belegt: Phenobarbital und andere Barbiturate sowie Hydantoine; Dexamethason; Rifampicin; Proadifen; Clotrimazol; Benzodiazepine, daneben halogenierte Pestizide und Stoffwechselprodukte von Pflanzen. Dagegen zeigte 3-MC keinen induzierenden Effekt auf CYP2-Enzyme. Die durch die CYP2E-Familie umgesetzten niedermolekularen Lösungsmittel, wie Aceton, Ethanol und Pyridin induzieren gleichzeitig ihre eigene Umsetzung. Außerdem wird Isoniazid als Induktor von CYP2E-Enzymen genannt. [93] In die Gruppe der Induktoren von Enzymen der **Cytochrom 3-Familie** fällt eine Vielzahl der am Markt befindlichen Arzneistoffe mit unterschiedlich stark ausgeprägten Induktionskapazitäten. Hervorzuheben sind hier einige, häufig auch für Modellreaktionen eingesetzte, Substanzen. Ein schon Anfang der 70iger Jahre des 20. Jahrhunderts an Rattenleber charakterisierter Induktor ist Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril [191], das als Induktor menschlicher CYP3A keine Rolle spielt. Für den Menschen relevant sind u.a. Substanzen wie Carbamazepin, Dexamethason, einige Statine, Omeprazol, Phenobarbital, Phenytoin, Rifampicin und Terbinafin, als auch Clotrimazol, Erythromycin und Troleandomycin (TAO), die gleichzeitig Induktor, Inhibitor und Substrat sind [123]. Auch jüngere Antiepileptika sind hier von Belang [19].

Bei der **Cytochrom 4-Familie** sind vor allem Peroxisomen-Proliferatoren von Bedeutung. Als Induktor kam in den meisten Untersuchungen Clofibrat zum Einsatz, daneben fand Methylclofenapat Verwendung. Allerdings standen für Clofibrat nicht nur CYP4A-induzierende Wirkungen, sondern auch eine Erhöhung der Level an CYP2B1/2, 2C6 und 3A1 und die Induktion von Azoreduktasen. Eine Abbildung über entsprechende Peroxisomen-Proliferatoren mit ihren Strukturen findet sich bei Ioannides,C. [93]

Mit der Selektivität der INHIBITOREN verhält es sich ähnlich, wie für die Induktoren geschildert. Jedoch kann hier noch weniger eine Zuordnung zu einzelnen Cytochrom-Familien und erst recht nicht zu einzelnen Enzyme erfolgen. Deshalb anschließend nur eine grobe Charakterisierung der CYP-Familien mit darauf folgenden Erläuterungen zu den Inhibitoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Prinzipiell kann die Enzymhemmung durch eine verminderte Synthese, den verstärkten Ab-

bau oder einen Funktionsverlust des CYP- Enzyms, hervorgerufen durch Konformationsveränderung, erfolgen [151]. Es ist eine direkte Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat am aktiven Zentrum des Enzyms möglich (kompetitive Hemmung), als auch eine Bindung außerhalb des aktiven Enzymzentrums. Letztere führt meist zu Veränderungen des aktiven Zentrums in deren Folge das Substrat nicht mehr (ausreichend) metabolisiert werden kann (nicht-kompetitive, allosterische Hemmung) [32;137].

Als Inhibitor der *Cytochrom 1-Familie* wird hauptsächlich  $\alpha$ -NP genannt, daneben finden noch 1-Ethynylpyren (CYP1A1) und Furafyllin (1A2) Erwähnung, für die eine relative Spezifität zu den angegebenen Enzymen postuliert wurde [114]. Chang et al. belegten eine CYP 1A- hemmende Wirkung für Diethyldithiocarbamat [39].

In der *Cytochrom 2-Familie* sind hemmende Wirkungen von  $\alpha$ -NP [39;148], den Azol- Antimykotika [120] und Methoxsalen [120] auf CYP2A beschrieben. Ferner spielte bei Mäusen noch Metyrapon eine Rolle. Für die im menschlichen Gewebe nur selten nachgewiesene Subfamilie 2B kämen noch Secobarbital, Troleandomycin, Proadifen [14;33] und Phenytoin hinzu. Als recht spezifischer CYP2D- Inhibitor gilt Chinidin [27]. Für CYP2E1 sind die Aussagen etwas schwieriger, da dieses Enzym die Umsetzung verschiedener Substrate katalysiert. So verschieden wie die Substrate (z.B. Chlorzoxazon, Paracetamol, Coffein) sind auch deren zugehörige Inhibitoren. Als CYP2E1- Inhibitoren werden Diethyldithiocarbamat, Disulfiram und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie z.B. Diallylsulfide genannt. [93]

Bei der Enzymhemmung der *Cytochrom 3-Familie* spielen vor allem die Makrolide Erythromycin und TAO, das Gestagen Gestoden sowie der kompetitive Inhibitor Ketoconazol eine Rolle [123]. Daneben erwiesen sich Clotrimazol und Miconazol als starke Hemmer des CYP-3A4 [124]. Weiter sind hier zu nennen: Antidepressiva (z.B. Fluvoxamin, Sertralin, Paroxetin), Clarithromycin und Cimetidin, welches nicht alle CYP3A- Substrate beeinflusst [44].

Über die Hemmung der Enzyme der *Cytochrom 4- Familie* gibt es nur wenige Angaben. Meist wurde Metyrapon, welches auch CYP2- Enzyme hemmt, eingesetzt [60;136].

Für den Inhibitor  **$\alpha$ -Naphthoflavon** steht die Hemmung der CYP1A1/2- Enzyme im Vordergrund, darüber hinaus konnten auch inhibierende Effekte auf 2C8/9 belegt werden. Bei erhöhten  $\alpha$ -NP- Konzentrationen von 10 $\mu$ M wurde an HepG2- Zellen zusätzlich eine Hemmung der Enzyme 2A6 und 2B6 festgestellt, während die Enzyme 2E1, 3A3, 3A4 und 3A5 unbeeinflusst blieben [39].

**Proadifen** wird unterschiedlich beschrieben, als spezifisch für CYP2B1 [114], aber auch als ein genereller Inhibitor, der auf mehrer Enzyme der CYP2B- Subfamilie wirkt [14;33]. Daneben erwies es sich als Inhibitor der CYP2A6- vermittelten Coumarin- 7-Hydroxylase in humanen Lebermikrosomen [148]. An der Ratte konnten für Proadifen neben den hemmenden Effekten auf CYP2B gleichzeitig induzierende Effekte desselben Enzyms ausgemacht werden [15]. Dieses Verhalten ist auch für andere CYP2B- Inhibitoren beschrieben [93]. Als Mechanismus der Hemmung wird vermutet, dass Proadifen durch P-450 N-deethyliert und zum N-Oxid (oder Nitroso- Derivat) umgewandelt wird, dieses vermag in der Folge als Ligand des

Häm zu agieren [114]. Bei Ioannides, C. findet sich im Kapitel Molecular Modeling eine Abbildung, die die These, dass das Stickstoffatom des Proadifen als Ligand des Häm fungiert, stützt [93]. Dort sind für Proadifen außerdem induzierende Effekte auf CYP 3A- Enzyme beschrieben.

Bei **TAO** handelt es sich um einen Inhibitor, der gleichzeitig seinen eigenen Abbau katalysiert und das Substrat darstellt. So konnten an menschlichen und Rattenleber- Mikrosomen einige CYP 450- Enzyme induziert und andere gehemmt werden [123;150]. Die Hemmung bezieht sich vor allem auf CYP3A- Enzyme. Es konnte der Nachweis der Inhibition von Testosteron- Hydroxylierungsprodukten anhand primärer Hepatozytenzellkulturen von Ziege, Schaf und Rind erbracht werden [8]. In einer breit angelegten Studie, zur Untersuchung von Inhibitoren des menschlichen Cytochrom P-450 erwies sich TAO als potenter Inhibitor von CYP3A3 und 3A4 neben, in etwas geringerem Umfang, 3A5, während CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9 und 2E1 unbeeinflusst blieben [39]. TAO wird heute als ein selektiver Inhibitor der CYP3A- Subfamilie verwendet.

**Metyrapon** ist gekennzeichnet als CYP2B- und CYP4A- Inhibitor. Da, wie schon erwähnt, für humanes Gewebe CYP2B-Enzyme kaum eine Rolle spielen, sind hemmende Wirkungen vorwiegend auf die Beeinflussung der CYP4A- Enzyme zurückzuführen [68].

### 3.5 Biotransformation

Biotransformationen stellen für Mensch und Tier eine lebensnotwendige Grundlage zur Ausscheidung von Xenobiotika aus dem Organismus dar. Die dabei ablaufenden Prozesse geschehen in 2 Phasen, die als Phase-I- und Phase-II- Reaktionen bezeichnet werden.

#### 3.5.1 Phase-I-Reaktionen

Reaktionen, welche zur Phase I des Fremdstoffmetabolismus gehören, zeichnen sich durch die Bildung neuer funktioneller Gruppen (z.B. -OH) aus. Es kann auch eine Umwandlung vorhandener funktioneller Gruppen erfolgen (z.B. O- und N- Dealkylierungen). (Eine Übersicht ohne Anspruch auf Vollständigkeit bietet die Tabelle 3.5.1.)

**Tab. 3.5.1:** Überblick über Phase-I-Reaktionen nach [214]

<u>Monooxygenase- Aktivität</u> (Oxidation)	<u>Oxidase- Aktivität</u>	<u>Reduktase- Aktivität</u>
·Aromatische Oxidation	·Aromatische Hydroxylierung	·Azo- Reduktion
·Aliphatische Oxidation	·Oxidation von Ethanol (ADH)	·Nitro- Reduktion aromatischer Verbindungen
·Epoxidierung	·Katechol Oxidation (MAO)	·Reduktive Dehalogenierung
·O- Dealkylierung		
·N- Dealkylierung		
·S- Dealkylierung		
·Oxidative Deaminierung		
·N- Hydroxylierung		
·N- und S-Oxidierung		
·Desulfurierung		

In der Folge der Reaktion steigt die Hydrophilie der ursprünglichen Verbindung. An den Pha-

se-I-Reaktionen sind eine Vielzahl von Cytochrom- Enzymen beteiligt, aber auch andere Enzyme, wie Alkoholdehydrogenasen (ADH), Monoaminoxidasen (MAO), die Flavin-Monooxygenase und noch weitere Enzyme zählen hierzu. Da Phase-I- Metabolite häufig noch wirksame Verbindungen darstellen, bzw. erst diese neu entstandenen Metabolite auf den Organismus toxisch wirken, schließen sich im Körper so genannte Phase-II- Reaktionen zur weiteren Detoxifikation an.

### 3.5.2 Phase-II-Reaktionen

Bei den Enzymen, die Phase-II-Reaktionen katalysieren, handelt es sich nicht um Cytochrom-P450- Enzyme. Die entstehenden Phase-II- Metabolite sind, mit Ausnahme von Acetyl- und Methylverbindungen, sehr hydrophil, so dass sie leicht aus dem Körper ausgeschieden werden können. Nur in seltenen Fällen besitzen diese Substanzen noch eine pharmakologische oder toxische Wirkung, als Beispiel sei das Morphin-6-glucuronid genannt, das dem Morphin in seiner Wirksamkeit überlegen ist. Enzyme, welche Phase-II-Reaktionen katalysieren, gehören zu den Transferasen, dabei sind relevant:

- *Glucuronidierung* vermittelt durch UDP- Glucuronosyltransferasen
- *Sulfatierung* durch Sulfotransferasen
- *Glutathion- Konjugation* durch Glutathion-S- Transferasen
- *Acetylierung* durch N-Acetyltransferasen
- *Acylierung* durch Acyltransferasen
- *Methylierung* durch Methyltransferasen (S-Methyltransferasen und COMT)
- *Konjugation mit Aminosäuren* durch N-Acyltransferasen

Einige Autoren verwenden auch den Begriff von Phase-III- Reaktionen und fassen darunter hauptsächlich Hydrolyse-Reaktionen der Phase-II- Metabolite zusammen, die Bedeutung für den enterohepatische Kreislauf besitzen [22;23;214].

### 3.5.3 Bestimmung der Enzymaktivität

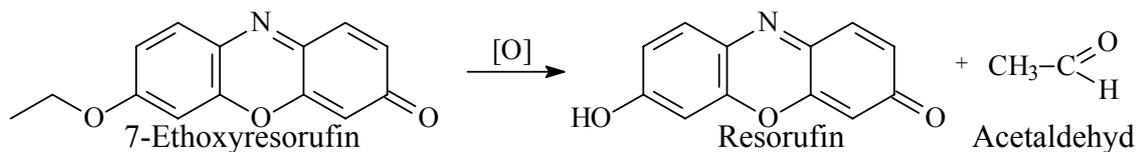
Zur biochemischen Charakterisierung einzelner Enzyme oder Enzymfamilien werden häufig so genannte Enzymvermittelte Indikatorreaktionen herangezogen. Da diese Reaktionen für das jeweilige Enzym Modellcharakter besitzen, werden sie auch als Modellreaktionen bezeichnet. Im Idealfall repräsentiert eine solche Reaktion die Aktivität eines einzelnen Isoenzym [108].

#### 3.5.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die EROD ist eine sehr häufig verwendete Modellreaktion zur Charakterisierung der Isoenzyme CYP 1A1 und 1A2. Beide Enzyme besitzen beim Menschen eine Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz von ca.72%. Es ist mit dieser Modellreaktion nicht möglich, zwischen 1A1 und 1A2 zu differenzieren, da beide Enzyme dieses Substrat umsetzen [93]. CYP 1A2 lässt sich anhand der Phenacetin-O-Deethylase (POD) näher charakterisieren, da Phenacetin allgemein als spezifisches Substrat dieses Enzyms gilt [85;171]. In der vorliegenden Arbeit an

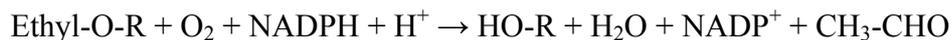
HaCaT- Keratinozyten fand die Phenacetin-O-Deethylierung keine Anwendung, da Studien erbrachten, dass die Phenacetin-O-Deethylase- Aktivität vor allem für die Umsetzung durch CYP1A2 in der Leber charakteristisch ist, während in extrahepatischem Gewebe, wie z.B. der Plazenta, diese Umsetzung durch andere Enzyme vermittelt wurde [182].

Die EROD beruht auf der recht spezifischen O- Deethylierung des Phenoxazonderivates 7-Ethoxyresorufin in Gegenwart von NADPH + H<sup>+</sup> und Sauerstoff. Die Umsetzung erfolgt durch Angriff des aktivierten Sauerstoffs am  $\alpha$ -C-Atom zum Heteroatom unter Bildung eines Halbacetals, das infolge seiner geringen Stabilität zu Acetaldehyd und dem stark fluoreszierendem Resorufin gespalten wird, dieses kann direkt im Kulturmedium erfasst werden. Die dazugehörige Reaktionsgleichung gibt Abb. 3.5.1 wieder.



**Abb. 3.5.1:** 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Formal lässt sich jede Deethylierung wie folgt zusammenfassen:



Der Fluoreszenz- Assay zur Ermittlung der EROD geht hauptsächlich auf Burke et al. zurück, und fand schon 1976 bei der Untersuchung an isolierten Darm- Mikrosomen der Ratte Anwendung [191]. Ein Jahr später wurden menschliche Lymphozyten [34] zum Einsatz gebracht und in der Folge Mikrosomen aus Leber, Lunge und Darm sowohl von Ratten als auch von Hamstern untersucht [35]. Ab Mitte der achtziger Jahre diente dieser Assay für vielfältigste Metabolisierungs- Untersuchungen an menschlichen Hepatozyten [77] und Leberzelllinien, wie HepG2 [78]. Die Verwendung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung zur fremdstoffmetabolischen Charakterisierung menschlicher Hautzellen wurde erst Anfang bis Mitte der neunziger Jahre vorangetrieben [8;125;159]. Mit der Etablierung der HaCaT- Zelllinie [26] stand diese auch für entsprechende Biotransformationsuntersuchen anhand der EROD zur Verfügung [8;42;46;48;110;209].

### 3.5.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Ebenso wie die EROD, wird auch die ECOD sehr oft als Modellreaktion zur Charakterisierung von Cytochrom- Isoenzymen herangezogen. Obwohl überwiegend durch CYP 1A1/A2 deethyliert [178], konnten auch Umsetzungen von 7-Ethoxycoumarin (EC) durch die Enzyme 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1, 3A3, 3A4 und 3A5 in menschlichem Gewebe belegt werden [93], daneben spielten bei Testungen an Ratten noch die Enzyme CYP 2A2, 2B1 und 3A2 für die ECOD eine Rolle [55;178]. Obwohl es sich bei der ECOD somit nicht um eine allzu spezifische Umsetzung handelt, ist doch der Vergleich zur 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung, die fast ausschließlich durch CYP 1A1/A2 erfolgt, interessant.

Die, auf der O- Deethylierung von 7-EC beruhende und in Gegenwart von NADPH + H<sup>+</sup> und Sauerstoff ablaufende, Reaktion liefert das stark fluoreszierende Produkt 7-Hydroxycoumarin



Isoenzym umgesetzt wird (85%), die anderen daran beteiligten Enzyme haben nur einen geringen Anteil. Mengenmäßig dominieren in Ratten neben der Androstendion-Bildung, die 2C11-vermittelte  $2\alpha$ - und  $16\alpha$ -OH-Testosteronbildung, sowie die 3A2-vermittelte  $6\beta$ -Hydroxylierung, die alle hauptsächlich für männliche Ratten charakteristisch sind [75;101]. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die CYP-Enzyme der Ratte, den entsprechend zugeordneten CYP-Enzymen des Menschen (soweit möglich) und den entstehenden Testosteron-Hydroxylierungsprodukten [114].

**Tab. 3.5.2:** CYP- Isoenzyme der Rattenleber, das dem Menschen zugeordnete adäquate CYP- Isoenzym und die beim Testosteron- Metabolismus vorwiegend entstehenden Hydroxylierungsprodukte (modifiziert nach [114])

CYP Ratte	CYP Mensch	Konstitutiv/ Induzierbar	Testosteron- Metabolisierungsprodukt (das Hervorgehobene stellt den Hauptweg dar)
1A1	1A1	I	<b>6<math>\beta</math></b>
1A2	1A2	K	<b>6<math>\beta</math></b>
2A1		K	<b>7<math>\alpha</math></b> , 6 $\alpha$
2A2		K	<b>15<math>\alpha</math></b> , 6 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , (7 $\beta$ )
2B1	2B6/2B7	I	16 $\alpha$ , 17, 16 $\beta$
2B2		K	16 $\alpha$ , 16 $\beta$
2C6		K	2 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17
2C7		K	16 $\alpha$
2C11	2C9	K	<b>16<math>\alpha</math></b> , <b>2<math>\alpha</math></b> , 17, 6 $\beta$
2C12		K	<b>15<math>\beta</math></b> , (15 $\alpha$ )
2C13	2C8	K	6 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 7 $\alpha$
2D1	2D6	K	6 $\beta$
3A1	3A3/3A4	I	<b>6<math>\beta</math></b>
3A2	3A5/3A7	K	6 $\beta$ , 2 $\beta$

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei den Daten der Tabelle 3.5.2 um Ergebnisse, die an Ratten gewonnen wurden. Bereits zwischen 1970 und 1980 wurde klar, dass sich das Verhalten in menschlichem Gewebe von dem der Ratten unterschied, insbesondere die bei den Tieren sehr stark ausgeprägte geschlechtliche Spezifität einzelner Isoenzyme, fand sich in dem Maß beim Mensch nicht wieder [170]. Auch unterscheidet sich die Menge der einzelnen Testosteronhydroxylierungsprodukte der humanen Hepatozyten von denen der Nager. In einer Studie von Kern et al. wurde deutlich, dass die vorherrschenden Produkte der Testosteronumsetzung in einer Primärkultur menschlicher Hepatozyten vor allem der  $6\beta$ -OH- und der  $2\beta$ -OH- Metabolit sind, gefolgt von der Bildung von Androstendion. Es spielten in geringerem Umfang eine Rolle:  $7\alpha$ -OH-,  $16\alpha$ -OH-,  $6\alpha$ -OH-,  $15\alpha$ -OH-,  $11\alpha$ -OH und das  $16\beta$ -OH-Testosteron. Der Einsatz des Induktors Rifampicin führte in diesen Untersuchungen nach 9-tägiger Kulturzeit zu einer 5,8fachen Erhöhung der Menge  $6\beta$ -OH-T in den menschlichen Hepatozyten, ein Effekt auf Rattenhepatozyten blieb aus. Besonders stark induzierbar war die Bildung der Metabolite  $7\alpha$ -OH- und  $11\alpha$ -OH- Testosteron in humanen Hepatozyten [101]. Untersuchungen an der humanen HepG2- Zelllinie führten hauptsächlich zu  $6\beta$ -OH-T, daneben entstanden noch  $2\beta$ -OH-T und  $15\beta$ -OH- Testosteron als Produkte der CYP3A- katalysierten Hydroxylierung von Testosteron. Daneben wurde noch eine durch CYP4B1 bedingte Umsetzung zu  $6\beta$ -OH-Testo beobachtet [206].

Frühe Untersuchungen zur Testosteronmetabolisierung in Hautzellen aus dem Jahr 1987 be- laufen sich auf Untersuchungen an Mikrosomen der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut von Ratten in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff. Dabei konnten 6 $\beta$ -OH-, 7 $\alpha$ -OH- und 16 $\alpha$ -OH-Testosteron nachgewiesen werden. Die größten Mengen erschienen davon in der Epidermis. Dort war eine Hemmung durch Proadifen und Metyrapon möglich. [135]

Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts kamen dann auch Untersuchungen an huma- ner Haut bzw. Modellen der Haut zur Charakterisierung des Testosteron- Metabolismus hinzu [167;186]. Nach der Etablierung der HaCaT- Zelllinie wurde auch sie auf ihren Testosteron- Metabolismus hin untersucht. Allerdings stand bei dieser Studie die Charakterisierung der 5 $\alpha$ - Reduktase im Vordergrund, eine Bestimmung der Testosteron- Hydroxylierungsprodukte er- folgte nicht [12]. In einer noch jüngeren Studie aus dem Jahr 2001, wurden 3 Zelllinien huma- nen Ursprungs, HaCaT- Zellen, die Sebozytenzelllinie SZ95 und die MeWo Melanom-Zellen, auf ihre Testosteronumsetzung hin untersucht. Es wurden dabei die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehy- drogenase (HSD), die 5 $\alpha$ -Reduktase und die 3 $\alpha$ -HSD genauer charakterisiert. In allen Zellty- pen dominierte die 17 $\beta$ -HSD- vermittelte Umsetzung zu Androstendion mit anschliessender Bildung von 5 $\alpha$ -Androstandion katalysiert durch die 5 $\alpha$ -Reduktase. In der Folge wurde durch die 3 $\alpha$ -HSD das 5 $\alpha$ -Androstandion zu Androsteron umgesetzt, mit der stärksten Aktivität in HaCaT- Zellen. Es wurden außerdem in allen Zelltypen geringe Mengen von 5 $\alpha$ -Dihydro- testosterone und 5 $\alpha$ -Androstandiol gefunden. Für HaCaT- Keratinozyten fand man so heraus, dass deren Aufgabe im Androgenstoffwechsel hauptsächlich im Abbau der Androgene, wie z.B. Testosteron, liegt. [62]

#### 3.5.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB)

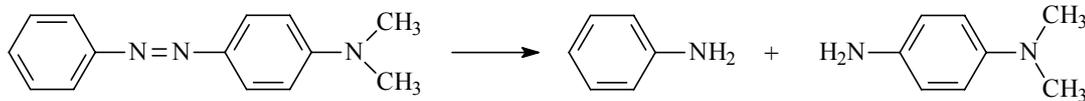
Bei der Reduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen (DAB) handelt es sich um eine Clofibrat- induzierbare Modellreaktion zur Charakterisierung des Cytochroms 4A. Verglichen mit den bisher beschriebenen Modelreaktionen kommt dieser eine eher untergeordnete Bedeu- tung zu. Standen bei der Charakterisierung von Phase-I-Reaktionen bisher Monooxygenase- und Oxidase- Aktivitäten im Mittelpunkt, spielen hier Reduktase- Aktivitäten, speziell die Azo- Reduktionen im Vordergrund. Neben der Entgiftung von Azoverbindungen durch CYP 4A, spielen auch die mikrosomale NADPH- Cytochrom P-450-Reduktase und zytosolische Reduktasen eine Rolle. [90-92;113;129;162;190;208]

Die Metabolisierung des DAB kann nicht nur reduktiv, sondern auch oxidativ per N-Deme- thylierung, Ringhydroxylierung und N-Hydroxylierung unter Beteiligung Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren- induzierbarer Cytochrome erfolgen. [132;171]

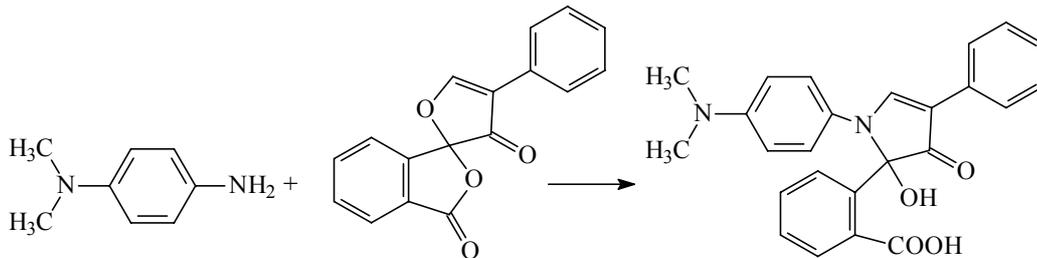
Die Bestimmung beruht auf der Methode von Huang et al. [91]. Das durch die Reduktion von DAB gebildete 4-(N,N-Dimethylamino)anilin wird durch nachfolgende Extraktion aufgerei- nigt, an Fluorescamin gekuppelt und das entstehende Produkt fluorimetrisch bestimmt. Durch die Wahl definierter Reinigungsschritte kann gewährleistet werden, dass nur das, bei der re- duktiven Spaltung entstehende, Anilinderivat nachgewiesen wird. Das bedeutet, dass mit dieser Methode zwar die Bestimmung des CYP 4A- vermittelten Anteils der Umsetzung be-

stimmerbar ist, jedoch kann auch über zytosolische oder mikrosomale Reduktasen gebildetes 4-(N,N-Dimethylamino)anilin mit erfasst werden. Es bleibt weiterhin der Anteil des DAB unberücksichtigt, der, wie oben angesprochen, oxidativ umgesetzt wird. [51;91;162]

Die beiden folgenden Abbildungen geben die Reaktionsgleichungen der Bestimmung wieder.



**Abb. 3.5.3:** Azoreduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen



**Abb. 3.5.4:** Kupplung von 4-(N,N-Dimethylanilin) an Fluorescamin

### 3.6 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)

Viabilitätsbestimmungen dienen der Erfassung geschädigter und toter Zellen. Unter dem Zelltod wird der irreversible Verlust von essentiellen zellulären Funktionen und Strukturen verstanden (M. Pirmohamed und K. Park in [210]). Zu dessen Ermittlung gibt es eine Reihe von Methoden, die jeweils unter verschiedenen Aspekten durchgeführt werden. Hinsichtlich der Exposition eines Agens kann grundsätzlich in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. Zum einen gibt es die Kurzzeittests, zu denen alle üblichen Vitalitätstests gehören, und zum anderen gibt es Langzeittests. Deren wichtigster Unterschied besteht in der Erfassung des Erhaltes der Reproduktionsfähigkeit von Zellen. Kurzzeittests erfassen nur Zellen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung (d.h. nach Noxenexposition) tot sind. Verspätete Reaktionen auf toxische Einflüsse oder aber im Gegenzug Reparaturmechanismen in den Zellen werden nicht berücksichtigt. Genauer spricht man daher bei den Kurzzeittests von der Ermittlung der *akuten* Toxizität und bei den Langzeittests von der Bestimmung der *Überlebensfähigkeit* [61].

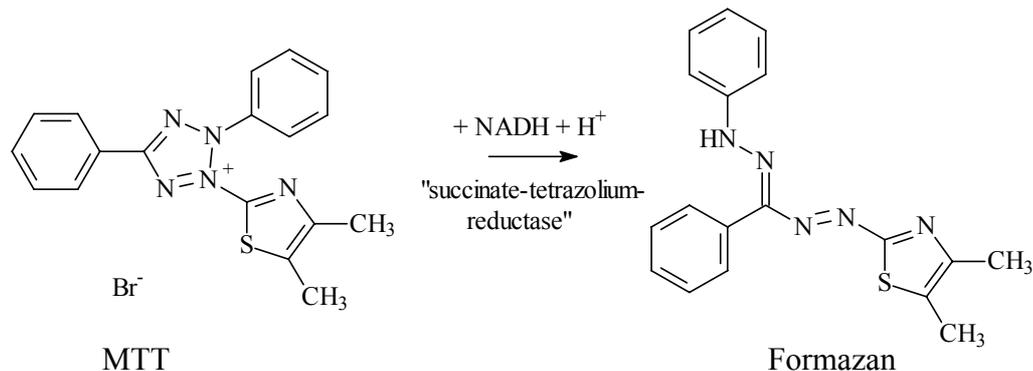
Die meisten Kurzzeittests beruhen auf dem Vorhandensein geschädigter Membranen toter Zellen, mit deren Hilfe Farbstoffausschluss- oder der Farbstoffaufnahmetests (Trypanblau-, Kristallviolett, Neutralrottest) entwickelt wurden. Auch die Freisetzung von Inhalten, die vitale Zellen zurückhalten, kann bestimmt werden (LDH- Test). Zu Vitalitätstests werden häufig auch metabolische Reaktionen herangezogen, die das Verhalten spezifischer Enzyme nutzen (MTT- Test). Ebenso besteht die Möglichkeit, nach Zelllyse das vorher in die DNA eingebautete  $^3\text{H}$ - Thymidin zu detektieren [61;210].

### 3.6.1 Neutralrottest

Im quantitativen Neutralrot (NR)- Test wird, wie oben erwähnt, die Membranintegrität nach Noxenexposition untersucht. Dabei wird während der Inkubationsphase der Farbstoff zunächst von allen Zellen aufgenommen, durch anschließendes Waschen (zumeist mit PBS) spült man dann sowohl überschüssigen Farbstoff, als auch das NR aus den toten Zellen heraus. Zellen mit intakter Membran haben den Farbstoff in ihr Lumen aufgenommen und halten ihn zurück. Die Lyse der ehemals lebenden, NR enthaltenden Zellen, setzt den Farbstoff frei und ermöglicht so eine quantitative photometrische Bestimmung bei 540 nm [24;25;116].

### 3.6.2 MTT- Test

Mit dem MTT- Test werden mitochondriale Schädigungen in den Zellen erfasst, das bedeutet, es ist mit diesem Test möglich, schwerere und tiefgehendere Zellschäden zu charakterisieren. Es handelt sich dabei ebenfalls um einen Assay zur Bestimmung von Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit bzw. zur Ermittlung der akuten Toxizität einer Substanz [24]. Er geht auf Mosmann [133] zurück und ist charakterisiert durch die Umwandlung des löslichen, schwach gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blau- violette, wasserunlösliche Formazan- Kristalle (Abb. 3.6.1). Dabei handelt es sich um eine reduktive Spaltung durch mitochondriale Dehydrogenasen, die nur in metabolisch aktiven Zellen von Bedeutung sind. Dies bedeutet, dass mit dem Ansteigen der Anzahl lebender Zellen eine Erhöhung der metabolischen Aktivität einhergeht und dies wiederum direkt mit der Menge gebildeter Formazan- Kristalle korreliert, messbar anhand der Absorption bei 570 nm nach Lyse der Kristalle und der Zellen durch ein Detergens. Dafür verwenden unterschiedliche Autoren verschiedene Detergenzien. So enthält das Cell Proliferation Kit I eine salzsaure SDS- Lösung [157], der Assay nach Mosmann verwendet salzsaure Isopropanollösung [133] und andere Autoren nutzen eine Mischung aus SDS, DMSO und Eisessig [116]. Der MTT- Assay zeigt Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien und mit dem Alter einer Kultur auf [201]. Auch Carmicheal et al. [37] stellten Unterschiede zwischen diversen Tumorzelllinien in der MTT- Reduktionskapazität und der damit verbundenen Chemosensitivität fest. Alle Autoren kommen zu dem Schluss, dass es notwendig ist, für jeden Zelltyp die optimalen Assay- Bedingungen zu ermitteln.



**Abb. 3.6.1:** Reduktive Spaltung des MTT zu Formazan

Für HeLa- Zellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass der NR-, der MTT- und der Kristallviolett- Assay bis auf einige wenige Ausnahmen übereinstimmende Werte in Toxizitätsstudien lieferten [40].

### **3.7 BioRad- Proteinbestimmung**

Bei dem BioRad- Assay handelt es sich um ein kommerzielles Kit (Bio-Rad, München), das auf der Bradford- Methode basiert. Bei dieser Methode entsteht ein farbiger Komplex aus den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten kationischer Proteine und dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 im sauren Milieu. Dadurch kommt es zur bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie-Brillantblau von 465 nm nach 595 nm, die am Farbumschlag von braun nach blau optisch ersichtlich ist. Die Extinktionszunahme bei 595 nm stellt ein Maß der Proteinkonzentration der bestimmten Lösung dar.

Der Bradford- Assay ist von den Färbetests zur Proteinbestimmung einer der sensitivsten und schnellsten. Bereits nach 5 min kann der Protein- Farbstoff- Komplex vermessen werden und bleibt bis zu einer Stunde stabil. Auch die Anfälligkeit gegenüber Reduktionsmitteln und anderen störenden Substanzen ist vergleichsweise gering, so haben Triton X-100 und SDS bis zu einem Gehalt von 0,1 % keinen Einfluss auf die Methode. Mit dem BioRad- Assay lassen sich nur lösliche Proteine bestimmen. Das bedeutet, dass membrangebundene Proteine und Ganz- Zell- Lysate erst aufgeschlossen und damit in eine lösliche Form überführt werden müssen. Zumeist geschieht dies mit Detergentien.

Der Nachteil dieses Assays liegt in dessen Subjektivität durch den Bezug auf ein Standardprotein. So ist es möglich, dass es bei Verwendung von gleichen Konzentrationen unterschiedlicher Standardproteine zu Differenzen kommen kann [118;156].

## 4 Material und Methoden

### 4.1 HaCaT- Keratinozyten- Zellkultur

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit der Keratinozyten- Zelllinie HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperature*) der Passage 36 bis 84 durchgeführt. Dies sollte eine gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglichen. Alle Versuche zu den Modellreaktionen EROD und ECOD wurden zu unterschiedlichen Zeiten mit je einer niedrigen und einer höheren Passagezahl durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zum Ausgleich der nicht ganz einheitlichen Aussaatdichten, sowie Schwankungen, die sich durch zeitlich ungleiche Medienwechsel und in der Folge unterschiedlicher Wachstumsdauer ergaben, wurden alle Versuche bei gerade einsetzender Konfluenz des Zellrasens begonnen. Lediglich die Toxizitätstests fanden daneben auch bei einer Konfluenz von 50% und darunter statt, da dies die Effekte deutlicher zum Vorschein bringen sollte.

Aus allen Substraten, die zur Anwendung kamen, wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt und diese vor ihrer Verwendung mit Medium auf die jeweilige Arbeitskonzentration eingestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die maximale Endkonzentration an DMSO nicht mehr als 0,5% betrug, um nachgewiesene membrantoxische Effekte auszuschließen. [111;134]

#### 4.1.1 Kulturbedingungen, Subkultivierung und Passagierung der Keratinozyten

Alle Arbeiten an der Zellkultur erfolgten unter einer Laminar- Flow- Box mit Lösungen, die vor ihrer Verwendung auf 37°C temperiert wurden. Für die Zellkultur wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco (Nr.: 21969) verwendet, welches einen Glukoseanteil von 4500mg/l besitzt, außerdem enthielt es Natriumpyruvat (110mg/l), Phenolrot und Pyridoxin. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium komplementiert mit 5ml einer Gentamicin (5mg)- L-Glutamin (200mM)- Lösung und 56ml Fötalem Kälberserum. Im Komplettmedium ergaben sich damit Arbeitskonzentrationen von 2 mM L-Glutamin, 10µg/ml Gentamicin (Wirkspektrum: Gram (+) und Gram (-) Bakterien, Mykoplasmen) und 10% FKS. (Wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff „Medium“ verwendet, handelt es sich immer um Komplettmedium.)

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von Freshney [61]. Dazu wurden die HaCaT- Keratinozyten in einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen /ml in 11 ml Komplettmedium in eine Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) mit Schräghals ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>- Begasung sowie einer Luftfeuchtigkeit von 100% unter Lichtausschluss inkubiert. Zum besseren Gasaustausch wurden die Flaschen mit Verschlusskappen, die einen Sterilfilter enthielten verschlossen. In der Regel erfolgte nach 24 Stunden und nach 4 Tagen ein Mediumwechsel, indem das alte Medium abgesaugt und gegen 12ml frisches Medium ausgetauscht wurde. Sobald die Zellkultur 100%ige Konfluenz erreichte (in der Regel nach 7

Tagen), oder zumindest einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, der Zellrasen einige Minuten mit 5 ml PBS gespült, um tote und nicht adhärenente Zellen zu entfernen, diese Lösung ebenfalls entsorgt und schließlich 3 ml Trypsin/ EDTA (0,05%/ 0,02%) den Zellen zugesetzt. Damit wurde solange inkubiert, bis unter dem Mikroskop das Abrunden der Zellen ersichtlich war, nun konnte die Trypsinlösung entfernt und die Gewebekulturflasche für 5min im Brutschrank weiter inkubiert werden, dadurch lösten sich die sehr fest am Boden haftenden HaCaT- Zellen ab. Durch leichtes Klopfen an Flaschenrand und -boden und nachspülen mit 10 ml Medium entstand eine Suspension der Zellen. Diese wurde mehrmals durch eine Pipette aspiriert, um die Zellen zu dissoziieren, deren Dichte darauf folgend mittels CASY- Zellzählgerät ermittelt wurde. Zur weiteren Kultur konnte wie oben angegeben verfahren werden.

Für die einzelnen Versuche wurde nun die Suspension weiter mit Medium verdünnt. Dabei kamen in den Viabilitätstests eine Aussaatdichte von ca. 1 bis  $4 \times 10^4$  Zellen/ ml in 96- Well-MTP und für alle anderen Versuche 1 bis  $4 \times 10^5$  Zellen/ ml in 24- Well- MTP zum Einsatz. Das Aussaatvolumen betrug im ersten Fall je 200 $\mu$ l und für die 24- Well- Platten je 1 ml.

Da in photometrischen Bestimmungen das Phenolrot des Mediums stört, wurden für die Einheitlichkeit aller Versuche jegliche Substanz- Lösungen in DMEM ohne Phenolrot hergestellt. Diesem Medium mussten zusätzlich 5,6 ml Natriumpyruvatlösung 100 mM zugesetzt werden, um dem phenolrothaltigem Medium genau zu entsprechen. Der Austausch auf phenolrotfreies Medium erfolgte immer zu Versuchsbeginn. Ebenso wurde die stets mitgeführte Kontrolle aus Zellen plus Medium ohne Testsubstanz zum gleichen Zeitpunkt gegen farbloses Medium getauscht.

## **4.2 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)**

### **4.2.1 Neutralrottest**

Für diesen Test wurden je 200 $\mu$ l einer Suspension HaCaT- Zellen mit ca.  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in eine 96-Well MTP ausgesät, dabei blieb eine Reihe von 8 Wells als photometrischer Blank frei. Nach Inkubation im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 50% (1 bis 2 Tage) oder bis zur 100%igen Konfluenz (ca. 3 Tage) wurde das alte Medium entfernt und je 100 $\mu$ l der Testsubstanzen sowie 100 $\mu$ l farbloses Medium als Kontrolle zugegeben (jeweils als 8-fach Bestimmung pro Konzentration). Die nun folgenden Inkubationszeiten variierten mit der Problemstellung. Um negative Einflüsse durch verbrauchtes Medium zu verhindern, wurden nach 72h alle Lösungen durch frische ersetzt. Nach beendeter Inkubation wurden sämtliche Medien entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann 100 $\mu$ l der NR- Lösung (unter Lichtabschluss auf 37°C vortemperiert) auf jedes Well gegeben. Es schloss sich eine weitere Inkubation über 3 Stunden im Brutschrank an. Nun konnten die NR- Lösungen von der Platte abgeschüttet und jedes Well zweimal mit PBS gewaschen werden, um alle Reste von überschüssigem, nicht in die Zellen aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Dann wurden zügig je 200 $\mu$ l der Ethanol/ Eisessig- Lösung in jedes Well gegeben und die gut verschlossene Platte 20 min

auf dem Plattenschüttler durchmischt, dies bewirkte den Tod der Zellen, die Zerstörung der Zellmembranen und damit das Freisetzen des in die Zellen aufgenommenen Farbstoffes. Die Extinktion der Farbstofflösung wurde bei 540 nm mit dem Plattenreader bestimmt.

#### 4.2.2 MTT- Test

Ähnlich dem NR- Test wurde die HaCaT- Zellsuspension in einer Dichte von ca.  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in 96-Well MTP ausgesät, mit Ausnahme einer Reihe für den photometrischen Blank. Die folgende Inkubation im Brutschrank dauerte bis zu einer Konfluenz des Zellrasens von ca. 40-50% (1 bis 2 Tage), einige Versuche wurden auch bei einer Konfluenz von ca. 70% oder 100% begonnen. Die Zugabe von 100µl der Testsubstanzen als 8-fache Bestimmung erfolgte nach dem Absaugen des alten Mediums und Einstellen der zu untersuchenden Konzentrationen aus den DMSO- haltigen Stammlösungen mit farblosem Medium. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit farblosem Medium ohne Substanzen inkubiert wurden. Die anschließende Inkubation dauerte zumeist 72 Stunden, bei längeren Versuchen wurden alle Lösungen nach 72 Stunden erneuert, war dies nicht der Fall, wird es bei dem speziellen Versuch angegeben. Der eigentliche Test ist eine Kombination der Assays von Mosmann [133] und Lindl [116] und erwies sich für die HaCaT- Keratinozyten als am besten geeignet. Die Durchführung ähnelt dem des Cell Proliferation Kit I (MTT) von Roche [157]. Das MTT- Reagenz wurde mit farblosem Medium 1:4 verdünnt und davon 10µl in jedes Well zu den Testsubstanzen pipettiert und durchmischt. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank hatten sich Formazan- Kristalle in den Zellen gebildet, nun konnte je 100µl des MTT- Lösepuffers zugesetzt werden. Es erfolgte eine weitere Inkubation zumeist über Nacht, jedoch für mindestens 20 Stunden, denn so lange dauerte es, bis sich die Kristalle auflösten. Nach 20-minütigem Homogenisieren der MTP auf dem Plattenschüttler bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm vermessen. Der photometrische Blank wurde in gleicher Weise mit MTT- Reagenz und -Lösepuffer behandelt.

#### 4.2.3 NR- und MTT- Test bei Bestrahlungsversuchen

Die Toxizitätsbestimmungen für Versuche mit Bestrahlung und ECOD- bzw. EROD- Bestimmung wurden analog den Modellreaktionen durchgeführt, d.h. die HaCaT- Zellen in einer Dichte von ca.  $1-5 \times 10^5$  Zellen/ml in 24- Well- Gewebekulturplatten ausgesät, inkubiert bis zur Konfluenz des Zellrasens, danach bestrahlt und anschließend Induktoren, Inhibitoren und/oder Substrate zugegeben. Nach Abschluss des eigentlichen Versuches konnte nun die Toxizität ermittelt werden. Zusätzlich wurden das Substrat allein und der Inhibitor allein getestet, um Aussagen zu deren Anteil an der Gesamtoxizität machen zu können. Dabei wurden diese Wells während der Induktion der Anderen mit Medium inkubiert und dann gleichzeitig auf die gesamte Platte Inhibitor und Substrat aufgebracht. Die Kontrolle stellte im Gegensatz zu den UV- Versuchen den reinen Medium- Kontrollwert dar.

Für die NR- Bestimmung setzte man den Zellen je Well 200µl der vortemperierten NR- Lösung zu, inkubierte 3h, schüttete alle Lösungen ab, spülte mit PBS und fügte anschließend

500µl der Ethanol/ Eisessig- Lösung zu. Die weitere Durchführung erfolgte analog der unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen.

Zur Ermittlung der Zytotoxizität durch den *MTT- Test* wurde den Zellen 20µl des unverdünnten MTT- Reagenzes zugesetzt und die Lösung durchmischt. Dabei verblieben die in den Wells vorhandenen Lösungen aus den vorangegangenen Versuchen, falls notwendig wurde vor MTT- Zugabe das Volumen auf 500µl reduziert. Nach 4-stündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 500µl MTT- Lösepuffer, die folgende Inkubation und Vermessung wurde gemäß Kapitel 4.2.2 durchgeführt.

Als Kontrolle diente in beiden Assays eine MTP, in die zu Versuchsbeginn HaCaT- Zellen eingesät wurden. Die danach folgende Bestrahlung und Zugabe von Induktoren, Inhibitoren und Substraten entfiel. Jedoch wurde beim Austausch von Medium oder Testsubstanzen in den Versuchsplatten gleichzeitig in der Kontrollplatte altes Medium in entsprechenden Volumina gegen neues ersetzt.

### **4.3 Bestimmung der CYP-450-Enzymaktivität**

#### **4.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)**

##### 4.3.1.1 Extinktionsspektrum

Für das bei der EROD gebildete Produkt Resorufin wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrophotometers ein Absorptions- und ein Emissionsspektrum bei 544 nm bzw. 590 nm aufgezeichnet. Dabei kam Resorufin in einer Konzentration von 1µM (=1000 pmol/ml) in DMEM (in Kapitel 5.1.1 als Medium B gekennzeichnet) zum Einsatz.

##### 4.3.1.2 Kalibrierung

Zur Bestimmung der Menge an gebildetem freien Resorufin wurden Standardlösungen mit 0; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 500; 600; 800; 1000 und 2000 pmol/ml Resorufin in Medium B hergestellt. Für die Vermessung der 24-Well-Gewebekulturplatten wurden jeweils 7 oder 8 dieser Lösungen herangezogen. Unmittelbar nach beendeter Inkubation wurden diese, unter Lichtausschluss auf 37°C temperiert und in die leeren Wells einer jeden Versuchsplatte in gleichen Volumina wie die Untersuchungslösungen gegeben. Es wurde 5 min bei 37°C unter Lichtausschluss geschüttelt und sofort darauf, immer noch bei 37°C, die Fluoreszenz, wie unter Kapitel 4.3.1.1 angegeben, vermessen. Dabei richtete sich die Auswahl der Standards nach der Stärke der, mit bloßem Auge erkennbaren, durch das Resorufin hervorgerufenen Fluoreszenz.

##### 4.3.1.3 Durchführung

Für alle Untersuchungen wurde jeweils 1ml HaCaT- Zellsuspension in einer Dichte von 1-2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml in 24-Well-Gewebekulturplatten ausgesät und bis zur einsetzenden Konfluenz unter den üblichen Kulturbedingungen (siehe Kapitel 4.1.1) inkubiert. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel. Für den photometrischen Blank und die spätere Aufgabe der Resorufin-Standardlösungen mussten mindesten 9 Wells leer bleiben.

### a) Ermittlung der Grundaktivität

Der Versuch startete nach Entfernen des alten Mediums und anschließender Zugabe von 7-Ethoxyresorufin (ER) in unterschiedlicher Konzentration in die entsprechenden Wells mit HaCaT- Zellen. Es wurde anschließend im Brutschrank inkubiert, die Inkubationszeiten variierten mit den einzelnen Versuchen. Nach 5minütigem Schütteln auf einem Plattenschüttler unter Lichtausschluss bei 37°C wurden die Platten sofort, ebenfalls bei 37°C vermessen. Dazu kam ein Plattenreader mit der Exzitationswellenlänge von 544 nm und der Emissionswellenlänge von 590 nm zum Einsatz. Neben jeweils 7 oder 8 der Standardlösungen zur Erstellung der Kalibriergeraden konnte so das freie, unkonjugierte Resorufin ermittelt werden. Darauf folgend wurden sämtliche Lösungen entfernt und die Zellen der Proteinbestimmung mittels BioRad- Assay zugeführt (siehe Kapitel 4.4).

### b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren

Als Induktoren fanden 3- Methylcholanthren (3-MC) und Phenobarbital (PB) Verwendung. Inhibiert wurde mit  $\alpha$ - Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) oder Proadifen (Pro).

Der Versuchsbeginn wurde zur Untersuchung des Verhaltens von Induktoren auf die HaCaT- Zellen so gewählt, dass die Konfluenz der Zellen bei 20-40% lag, in jedem Fall aber unter 50%. Es konnte ungefähr 24h nach Aussaat der Zellen das alte Medium entfernt und mit der Testung begonnen werden. Im Folgenden wurde jede Platte in 3 Gruppen unterteilt:

- I) Zugabe von *Medium*, 1 ml – als Kontrollwert der Grundaktivität
- II) Zugabe des jeweiligen *Induktors*, 1 ml – für die Ermittlung der induktiven Kapazität
- III) zunächst Zugabe des jeweiligen *Induktors*, 1ml, nach dessen Entfernung Zugabe des zu untersuchenden *Inhibitors* (immer unmittelbar vor Substratzugabe) – um Aussagen zu erhalten, inwiefern die hervorgerufenen Induktionen hemmbar sind.

Nachfolgend das Schema (Nr. 1) einer typischen Untersuchungsplatte gezeigt - die Standardlösungen wurden, wie oben erwähnt, unmittelbar vor der Vermessung zugegeben, bis dahin blieben diese Wells leer.

<b>A</b>	100	200	400	500	600	1000
<b>B</b>	50	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
<b>C</b>	B	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor
<b>D</b>	B	Induktor + Inhibitor				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>

Schema Nr. 1:

Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem Induktor (bzw. Medium) für unterschiedliche Zeiten, dies wurde mit dem Entfernen aller Lösungen und spülen mit je 500 $\mu$ l PBS beendet. Im Anschluss wurde der Inhibitor (500 $\mu$ l; 1,4-fache Konzentration der gewünschten Endkonzentration) in die entsprechenden Wells zugesetzt, und sofort mit 200 $\mu$ l ER (7 $\mu$ M) ergänzt. In die, mit Medium und Induktor allein behandelten Reihen, erfolgte ein Zusatz von 700 $\mu$ l ER (2 $\mu$ M). Damit ergab sich für alle Wells eine Endkonzentration von 2 $\mu$ M ER.

Falls nicht der Umsatz von ER bewusst über verschiedene Zeiten untersucht wurde, betrug die Inkubationszeit einheitlich 24h, um die Wirkung aller Induktoren / Inhibitoren vergleichen zu

können. Da der Inhibitor und das Substrat ER stets gleichzeitig zugesetzt wurden, war auch deren Inkubationszeit immer gleich, d.h. in den meisten Fällen 24h. Die anschließenden Schritte der Vermessung des freien Resorufins und der Proteinbestimmung erfolgten analog zu denen, die unter Punkt a) Ermittlung der Grundaktivität beschrieben wurde.

Es wurden alle Induktor / Inhibitor- Kombinationen auf 2 Platten parallel getestet und zu einem späteren Zeitpunkt wurde der gesamte Versuch wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Untersuchung zu gewährleisten.

### **c) Phase-II- Reaktionen (Glucuronidierung-/ Sulfatierung)**

Der Versuchsaufbau erfolgte analog den Erläuterungen unter Punkt b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren. Es wurde nur wenig variiert, die Konfluenz zu Versuchsbeginn betrug 60-80%, da die Induktionszeit auf maximal 48h begrenzt wurde. Die oben angegebenen drei Gruppen behielten ihre Gültigkeit, es wurden für jede Induktor/Inhibitor- Kombination 3 Platten parallel bearbeitet. Die Einwirkung von Inhibitor und Substrat ER betrug in allen Fällen 24h. Die Vermessung des bis dahin gebildeten freien Resorufins erfolgte, wie zuvor beschrieben. Danach verblieben alle Lösungen in den Platten. Die Parallel- Platten wurden unterteilt:

- 1.) Zugabe von 50µl einer  $\beta$ - Glucuronidase-/ Sulfatase- Mischung 0,04 U/ml
- 2.) Zugabe von 50µl einer  $\beta$ - Glucuronidase-/ Sulfatase- Mischung 20 U/ml
- 3.) keine weiteren Zusätze

Dabei wurde die Mischung unter 1) so gewählt, dass, falls alles eingesetzte ER (2µM) zu Resorufinglucuroniden bzw. -sulfaten umgesetzt würde, eine exakte Deglucuronidierung/ -sulfatierung stattfände. Die Mischung unter 2) arbeitete mit einem Überschuss an Enzym und die 3. Gruppe diente als Vergleich. Es folgte eine Inkubation von 3h unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank. Nachdem die Standardlösungen unter 1) und 2) um jeweils 50µl ergänzt wurden, konnte anschließend das freie Resorufin, das nun der Gesamtmenge an gebildetem Produkt entsprach, erneut vermessen werden.

*Anmerkung:* Das Enzymgemisch soll im sauren pH- Bereich optimale Umsatzraten haben, deshalb wurde in Vorversuchen zeitgleich mit dem Enzym ein Natriumacetat-Puffer pH4,5 den Wells zugesetzt, 3h inkubiert und darauf vermessen *oder* vor der Vermessung mit Glycin- Puffer pH10,5 auf den leicht basischen Ausgangs- pH-Wert von ca. 7,8-7,9 eingestellt. Im Ergebnis zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Werten ohne jegliche Pufferbehandlung, den sauren und den wieder neutralisierten Lösungen. Aus diesem Grund fand in den Versuchen der vorliegenden Arbeit kein Puffer bei der Deglucuronidierung/-sulfatierung des Resorufins Verwendung.

### **d) Bestrahlung mit UVA und UVB**

Die Zellaussaat erfolgte entsprechend Kapitel 4.1.1 in 24-Well-MTP mit einer Dichte von mind.  $5 \times 10^4$  Zellen/ml. Für jede unterschiedliche Bestrahlungsstufe wurde mind. eine MTP ausgesät sowie eine zusätzliche Platte, die als Kontrolle diente. Es wurde immer bis zur gerade einsetzenden Konfluenz inkubiert. Bei Erreichen dieser, konnte das alte Medium entfernt, einmal mit 500µl PBS gespült und für die Bestrahlung 500µl PBS in jedes Well pipettiert werden. Danach erfolgte die Bestrahlung, in Anlehnung an Vorgaben der Literatur entweder

mit UVA (1; 8 und 16 J/cm<sup>2</sup>) [158] oder UVB (25 und 50mJ/cm<sup>2</sup>) [69;121] – siehe auch Kap. 4.5 Die Kontrollplatte wurde nicht bestrahlt, jedoch gleichzeitig mit den Versuchsplatten erfolgte der Austausch an Lösungen und Medien. Nach der Bestrahlung wurden die PBS-Lösungen entfernt, je 1ml farbloses Medium auf die Zellen gegeben und für 24h im Brutschrank inkubiert, da laut Literatur nach dieser Zeit maximale Schädigungen durch UVB nachgewiesen wurden [83]. Anschließend konnte in Analogie zu Kap. 4.3.1.3 a und b) induziert, inkubiert und mit Substrat umgesetzt werden.

*Anmerkung:* Für UVB war außerdem die Testung von 100mJ/cm<sup>2</sup> vorgesehen, bei ersten Versuchen stellte sich aber heraus, dass dies zu toxisch für die HaCaT- Zellen war - die Zellen verloren durch die Bestrahlung ihre Haftung am Gefäßboden. Nach 24h im Brutschrank wurden, selbst bei vorsichtigstem Abgießen der Medien, nahezu alle Zellen aus den Wells entfernt. Deshalb beschränken sich alle UVB- Bestrahlungen auf 25 und 50mJ/cm<sup>2</sup>.

### 4.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

#### 4.3.2.1. Extinktionsspektrum

Für das bei der ECOD gebildete Produkt 7-Hydroxycoumarin (HC) wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz- Spektrophotometers ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum bei 390 nm bzw. 460 nm aufgezeichnet. Dabei kam HC in einer Konzentration von 1µM (=1000pmol/ml) in alkalischem, farblosem DMEM (Medium B<sub>alk</sub>) zum Einsatz.

#### 4.3.2.2. Kalibrierung

Da das Absorptionsspektrum des HC pH- abhängig ist (bei pH6 ist  $\lambda_{\max}$ =330nm, bei pH11 ist  $\lambda_{\max}$ =390 nm [10]), wurde mit Glycin- Puffer pH10,4 der pH- Wert der Medien vor der Herstellung der entsprechenden HC- Kalibrier- Konzentrationen alkalisiert.

Nach dem Austesten der Pufferkapazität unter den Inkubationsbedingungen von 5% CO<sub>2</sub> und unter Beachtung der Probenbehandlung, wurde ein alkalisches Medium (Medium B<sub>alk</sub>) aus 3 Teilen Medium B und 1 Teil Glycinpuffer pH 10,4 bereitet. Es resultierte ein pH- Wert zwischen 8 und 9,4, der für mindestens 24h stabil blieb. Dies erwies sich als ausreichend, da die Glycin- Behandlung 4h nie überschritt.

Zur Bestimmung der Menge an gebildetem freien 7-Hydroxycoumarin wurden Standardlösungen mit 0; 10; 12,5; 25; 50; 100; 200; 250; 400; 500; 800; 1000; 1600 pmol/ml HC in Medium B<sub>alk</sub> hergestellt. Für die Vermessung der 24-Well-Gewebekulturplatten wurden jeweils 7 oder 8 dieser Lösungen herangezogen. Unmittelbar nach beendeter Inkubation der Proben wurden diese, unter Lichtausschluss auf 37°C temperierten Standardlösungen, in die leeren Wells einer jeden Versuchsplatte gegeben, mit äquivalenten Volumina wie die Untersuchungslösungen. Es wurde 5 min bei 37°C unter Lichtausschluss geschüttelt und sofort darauf, immer noch bei 37°C, die Fluoreszenz, wie in Kap. 4.3.2.1 angegeben, vermessen. Dabei richtete sich die Auswahl der Standards nach der Stärke der mit bloßem Auge erkennbaren Fluoreszenz.

### 4.3.2.3 Durchführung

Die Aussaat in 24-Well-Platten erfolgte analog der EROD-Bestimmung (Kap. 4.3.1.3)

#### a) Ermittlung der Grundaktivität; Einsatz von Induktoren / Inhibitoren

Die Ermittlung von Grundumsatz, die Induzierbarkeit und die Hemmung der ECOD erfolgten in einem Schritt. Der Versuchsbeginn wurde bei den Untersuchungen ohne Bestrahlung so gewählt, dass die Konfluenz der Zellen um 80% lag. Somit konnte 24h nach Aussaat der Zellen das alte Medium entfernt und 500µl des Induktors (3-MC) oder 500µl Medium als Kontrolle zu den Zellen gegeben werden (linke Seite von Schema Nr. 2). Es wurde nun für unterschiedliche Zeiten im Brutschrank inkubiert und anschließend die Medien wieder entfernt. Es folgte jetzt die Zugabe von 500µl EC in Reihe B und C der Platten, bzw. 250µl Inhibitor (doppelte Konzentration der gewünschten Endkonzentration) + 250µl EC (doppelt konzentriert gegenüber Reihe B+C) in Reihe D (rechte Seite von Schema Nr. 2). Als Inhibitor wurden  $\alpha$ -NP oder Proadifen verwendet. Die Konzentrationen aller Substanzen variierten mit den verschiedenen Versuchen.

A	S2	S3	S4	S5	S6	S7
B	S1	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
C	B	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor
D	B	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor	Induktor
	1	2	3	4	5	6

S2	S3	S4	S5	S6	S7
S1	EC	EC	EC	EC	EC
B	EC	EC	EC	EC	EC
B	Inhibitor + EC				
1	2	3	4	5	6

Schema Nr. 2: ECOD-Bestimmung in einer 24-Well-Platte

S bedeuten leere Wells, die für die Standards bestimmt waren; B der photometrische Blank, der auch leer blieb; links: 1. Teil – Zugabe der Induktoren; rechts: 2. Teil – Zugabe der Inhibitoren und/oder des Substrates 7-EC

Die Reihe B repräsentiert den Grundumsatz von EC zu HC, Reihe C gibt die Induzierbarkeit wieder und Reihe D verdeutlicht, ob und in wieweit die vorherige Induktion gehemmt werden kann. Die Zeit mit den Induktoren betrug zum besseren Vergleich mit den EROD-Versuchen immer 24 Stunden. Anschließend an die eigentliche Umsetzung konnte das gebildete HC noch nicht vermessen werden. Die Versuche dazu scheiterten, d.h. es ergaben sich immer annähernd gleiche HC-Werte, die, ganz gleich, welche Behandlung sie erfuhren, keinerlei Veränderung zeigten. Nach unzähligen Versuchen mit Puffer-Variationen, führte die Verwendung einer  $\beta$ -Glucuronidase/ Sulfatase-Mischung zum Erfolg.

Nach der Substratumsetzung wurden alle Lösungen in eine neue 24-Well-Platte, unter Beibehaltung der Zuordnung, überführt. Die Platten mit den HaCaT-Zellen konnten der BioRad-Proteinbestimmung zugeführt werden (siehe Kapitel 4.4). Zu den Lösungen wurden 100µl Acetat-Puffer pH4,5 je Well gegeben, um den Medium-pH-Wert (7 bis 8) auf einen, für die  $\beta$ -Glucuronidase günstigeren, pH von 5 bis 6 herabzusetzen. Es wurden nun 50µl der  $\beta$ -Glucuronidase / Sulfatase-Mischung (10000U) in jedes Well gegeben und 3h im Brutschrank inkubiert. Danach musste der pH-Wert mit 400µl Glycin-Puffer pH 10,4 angehoben werden, um eine optimale fluorimetrische Detektion des gebildeten HC zu ermöglichen. Jetzt wurden die HC-Kalibrierlösungen in die entsprechenden freien Wells gegeben, die Platte 10 min unter Lichtausschluss bei 37°C geschüttelt und anschließend sofort auf dem Plattenreader vermes-

sen. So konnte bei einer Anregungswellenlänge 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm das freie, unkonjugierte 7-Hydroxycoumarin bestimmt werden.

### **b) Bestrahlung mit UVA und UVB**

Die Aussaat der HaCaT- Zellen erfolgte, wie bisher, in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Gewebekulturplatten. Es wurde unter den üblichen Kulturbedingungen (siehe Kap. 4.1.1) 24h inkubiert, was zu einer Konfluenz des Zellrasens von 80-90% führte.

Daraufhin konnte das alte Medium entfernt und, nach einmaligem Spülen mit 500µl PBS, gegen 500µl PBS ausgetauscht werden. Es schloss sich die Bestrahlung entweder mit UVA (1; 8 und 16 J/cm<sup>2</sup>) oder mit UVB (25 und 50mJ/cm<sup>2</sup>) an - siehe Kap. 4.5 Wie schon für EROD, wurden auch bei diesen Versuchen Kontrollplatten mitgeführt. Diese wurde nicht bestrahlt, aber gleichzeitig mit den Versuchsplatten erfolgte der Austausch an Lösungen und Medien.

Nach der Bestrahlung und Entfernung der PBS- Lösungen, konnte jedem Well 500µl Medium B zugesetzt und die Platten für weitere 24h im Brutschrank inkubiert werden.

Anschließend wurde, wie oben geschildert, induziert, inkubiert und mit Substrat umgesetzt.

## **4.3.3 Testosteron- Metabolisierung**

### 4.3.3.1 HPLC- Analytik, Kalibrierung

Zunächst wurde für alle zum Einsatz kommenden Substanzen ein Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Dabei wurde von allen Lösungen die erste Verdünnung in Medium B benutzt, d.h. alle Konzentrationen lagen über den im Test verwendeten Angaben und der Gehalt an DMSO belief sich in den meisten Fällen auf über 0,5%. Dies störte zu diesem Zeitpunkt nicht, da die Lösungen nicht mit den Zellen in Berührung kamen. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Chromatogramme aller Substanzen in den schon verwandten, hohen Konzentrationen. Die Bestandteile der HPLC- Anlage mit verwendetem Zubehör sind unter Kapitel 4.9 aufgeführt. Es kam ein Laufmittelgemisch aus Wasser und Methanol im Verhältnis 40/60 bei einem Fluss von 1,0 ml/min zum Einsatz, welches sich in Vorversuchen für die Trennung von Testosteron und dessen Metaboliten als am besten geeignet erwies. Alle chromatographischen Bestimmungen wurden bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Aus den Spektren und den Chromatogrammen sollten Aussagen über mögliche störende (überlagernde) Einflüsse gewonnen werden.

Es war nicht klar, wie HaCaT- Zellen Testosteron umsetzen, lediglich die Bildung von Androstendion war belegt [12;62] Deshalb wurde die Methodik zunächst an HepG2- Zellen, einer humanen Leberzelllinie mit bekannter CYP- vermittelter Testosteron- Metabolisierung [206], etabliert (Daten nicht dargestellt). Die Versuchsdurchführung orientierte sich an den Angaben von Kostrubsky et al. [105]. Darin wurden Aliquote Medium entnommen, die Testosteron incl. Metabolite enthielten, diese 1:1 mit Methanol versetzt und direkt der HPLC zugeführt. Es stellte sich aber schon nach wenigen Läufen heraus, dass dies einerseits die Säule sehr schnell sehr stark verschmutzte und andererseits ausschließlich Testosteron und Androsteron, aber keine Hydroxy- Metabolite, detektiert werden konnten. So wurde, wie bei allen anderen Autoren, die die HPLC zur Quantifizierung nutzten, ein Extraktionsschritt vorgeschaltet. Der

Literatur folgend, fanden Versuche mit den Extraktionsmitteln Diethylether [12], Dichlormethan [8] und Ethylacetat [96] statt. Letztlich fiel die Entscheidung auf die Verwendung von Diethylether. Dieser wurde nach der Extraktion verdunstet, darauf folgend konnten die Proben mit 100µl Methanol aufgenommen werden. So gelöst wurden die Proben der HPLC zugeführt und das Spektrum mittels DAD bei 242 nm aufgezeichnet.

Zunächst entstand aus allen beim Assay relevanten Substanzen eine Absorptionsspektrendatenbank. Darauf folgend wurde von allen eingesetzten Substanzen ein Chromatogramm unter Assay-Bedingungen aufgezeichnet. Von Testosteron, Andro, 2α-OH-T und 6β-OH-T wurden verschiedene Konzentrationen, gelöst in Methanol, bestimmt. Die so erhaltenen Werte ergaben eine Kalibriergerade, der die Peakflächen zugrunde lagen. Die Standardlösungen waren folgende:

Testo: 10; 25; 50; 100; 250 und 500µM

Andro: 10; 25; 50; 100; 250 und 500µM

2α/6β-OH-T: 1; 10; 25; 50; 80 und 100µM

#### 4.3.3.2 Durchführung

Die Aussaat in 24-Well-Platten erfolgte analog der EROD-Bestimmung (Kap. 4.3.1.3). Da bei dieser Bestimmung nicht in den Platten vermessen wurde, mussten weder Wells für die Standardlösungen, noch photometrische Blanks frei bleiben. Damit war immer eine 6-fach Bestimmung gegeben.

##### **a) Ermittlung der Grundaktivität**

Für jeden Versuch wurden zwei 24-Well-MTP analog behandelt. Der Versuch startete nach Entfernen des alten Mediums mit der Zugabe von 500µl Testosteron (Testo) in verschiedenen Konzentrationen in Medium B zu den HaCaT-Zellen. Es wurde anschließend für unterschiedliche Zeiten im Brutschrank inkubiert. Nach kurzem Schütteln auf einem Plattenschüttler unter Lichtausschluss bei RT wurden von einer der Platten nur die Lösungen vorsichtig entfernt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und von der anderen Platte die gesamte Zellsuspension verwendet. Jedem Reaktionsgefäß wurden nun 500µl Diethylether zugesetzt, ca. eine Minute auf dem Vortexer gemischt und anschließend die Zellfragmente abzentrifugiert (4000g / 10min / 10°C). Damit wurde gleichzeitig eine klare Phasentrennung erreicht. Die Ether-Phase konnte in HPLC-Röhrchen überführt werden, der Ether verdunstete. Danach wurden die Proben in je 100µl Methanol (HPLC rein) aufgenommen und per HPLC analysiert. Als Laufmittel diente Wasser und Methanol im Verhältnis 40/60 bei einem Fluss von 1,0 ml/min, das Injektionsvolumen betrug immer 20µl. Zum Nachweis der Metabolite und des Testosterons wurden die authentischen Standards herangezogen, von denen zuvor unter identischen Bedingungen eine Datenbank erstellt wurde. Die Quantifizierung konnte mit Hilfe der Kalibriergeraden erfolgen, der die Peakflächen zugrunde lagen.

##### **b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren**

Die Versuche begannen bei einsetzender Konfluenz des Zellrasens mit dem Entfernen des Mediums und der Zugabe von 500µl der Induktorlösungen. Es kamen zum Einsatz: 3-MC (2µM); PB (1mM); Rifampicin [Rif] (10µM) und Dexamethason [Dexa] (25µM). Als Kon-

trolle diente Medium B. Es fand eine 5fach Bestimmung jedes Induktors und eine 4fach Bestimmung der Medium- Kontrollen statt. Alle Versuche wurden in 24-Well- Platten durchgeführt. Anschließend an die verschiedenen Induktionszeiten wurden die alten Lösungen entfernt. Im Folgenden unterschieden sich die Untersuchungen. In einigen Versuchen ging es darum, die Abhängigkeit der Testosteronmetabolisierung von der Zeit mit den Induktoren und der Testo- Inkubationszeit zu untersuchen. Diesen Platten wurde 500µl Testosteron (250µM) zugesetzt und für 21h oder 48h inkubiert.

Ein anderer Aspekt war die Testung möglicher Inhibitoren. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben induziert, die Lösungen entfernt und anschließend die Inhibitoren  $\alpha$ -NP (0,5 oder 1µM), Proadifen (125 oder 250µM) und Triacetyloleandomycin (50 oder 250µM) den Zellen zugesetzt. Sofort darauf erfolgte die Zugabe von Testosteron (250µM). Die Angaben in Klammern bezeichnen jeweils die Endkonzentration in der Lösung, d.h. es wurde mit je 500µl der doppelt konzentrierten Lösung gearbeitet. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die gesamten Zellsuspensionen einzeln in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und ggf. bei -20°C gelagert. Anschließend konnte wie unter a) beschrieben mit Diethylether extrahiert, in Methanol aufgenommen und per HPLC analysiert werden.

### ***c) Bestrahlung mit UVA und UVB***

Die Versuche an HaCaT- Zellen inklusive Bestrahlung sollten nicht nur die Zellen betreffen, sondern auch den Einfluss der Induktoren unter Bestrahlung charakterisieren. Dadurch war es notwendig, für jede Bestrahlungsstufe mit den Zellen einer neuen Passage zu arbeiten. Es kamen folgende Passagen zum Einsatz: UVB 50mJ/cm<sup>2</sup> (P51); UVB 25mJ/cm<sup>2</sup> (P52); UVA 16 J/cm<sup>2</sup> (P54); UVA 8 J/cm<sup>2</sup> (P53) und UVA 1 J/cm<sup>2</sup> (P55). Es wurden parallel identische Versuche mit und ohne Bestrahlung durchgeführt.

Die Zellaussaat erfolgte analog den Induktions- / Inhibitionsversuchen. Bei einsetzender Konfluenz wurde das Medium von den Zellen entfernt, mit 500µl PBS gespült und vor der Bestrahlung 500µl PBS in jedes Well gegeben. Nun folgte die Bestrahlung mit den oben angegebenen UV- Dosen. Die Kontrollplatten wurden nicht bestrahlt, aber gleichzeitig mit den Versuchsplatten erfolgte der Austausch an Lösungen und Medien. Nach der Bestrahlung wurden alle alten Lösungen entfernt, je 1ml farbloses Medium auf die Zellen gegeben und für 24h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Medien entfernt und analog Punkt b) die Induktor- Lösungen (oder Medium als Kontrolle) und später das Substrat Testosteron zugesetzt. Alle Induktionszeiten betragen 72h, die Zeit mit Testo lag einheitlich bei 48h. Die Endkonzentrationen aller Lösungen entsprachen denen aus den vorangegangenen Versuchen. Nach beendeter Umsetzungszeit wurden die gesamten Zellsuspensionen in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und ggf. bei -20°C gelagert. Daran schloss sich das unter a) beschriebene Extraktionsverfahren und die Vermessung per HPLC an.

#### 4.3.3.3 Ermittlung der Wiederfindungsraten nach Extraktion

Vom Substrat Testosteron wurden Lösungen in den Konzentrationen 60µM; 100µM und 250µM in Medium B hergestellt. Für die Metabolite Androstendion und 6β-OH-Testosteron

lagen die Konzentrationen der zu untersuchenden Lösungen bei 10 $\mu$ M; 50 $\mu$ M und 100 $\mu$ M. Von jeder dieser Lösungen wurden 12 Proben zu je 500 $\mu$ l in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 500 $\mu$ l Diethylether versetzt, diese eine Minute auf dem Vortexer durchmischt und weiter wie unter Kapitel 4.3.3.2 a) beschrieben zentrifugiert. Darauf folgend konnten die Etherphasen in HPLC- Röhren überführt, der Ether verdunstet und anschließend die Proben mit 100 $\mu$ l Methanol wieder aufgenommen und der Quantifizierung per HPLC zugeführt werden (Wasser/ Methanol: 40/60; Fluss: 1,0 ml/min).

#### **4.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen- Reduktion (DAB)**

##### 4.3.4.1 Extinktionsspektrum

4-(N,N-Dimethylamino)anilin (1mM) wurde mit Fluorescamin unter Lichtausschluss gekuppelt. Es erfolgte eine 1:100 Verdünnung in Essigsäure- Natriumacetatpuffer (0,1 M) pH 4,0. Die Aufnahme des Anregungs- und des Emissionsspektrums erfolgte bei 405 nm / 520 nm mit einem Fluoreszenz- Spektrophotometer.

##### 4.3.4.2 Kalibrierung

Zur Bestimmung der Menge an gebildetem Kupplungsprodukt wurde eine Kalibriergerade aus Lösungen von 4-(N,N-Dimethylamino)anilin in Essigsäure- Natriumacetatpuffer (0,1 M) pH 4,0 erstellt. Die dabei verwendeten Konzentrationen betragen 0; 50; 100; 125; 150; 175 und 200 nmol/ml. Je 1ml von jeder dieser Lösungen wurde in die leeren Wells der zu vermessenden 24-Well- Versuchsplatten gegeben. Danach konnte, analog zu den Proben, mit 50 $\mu$ l Fluorescamin- Lösung (1,5 mM) unter Lichtausschluss die Kupplungsreaktion ermöglicht werden. Die Vermessung der Fluoreszenz des entstandenen Kupplungsproduktes erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

##### 4.3.4.3 Durchführung

###### **a) Ermittlung der Grundaktivität**

Es wurde je 1ml HaCaT- Zellsuspension in vier 24-Well-MTP in einer Dichte von 1-2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät. Dabei blieben 9 Wells leer, zwei als Blank und sieben für die Kalibrierlösungen. Nun konnte unter Kulturbedingungen bis zur einsetzenden Konfluenz inkubiert werden. Nach dem Entfernen des alten Mediums wurde je 1ml DAB (200 $\mu$ M) in die entsprechenden Wells pipettiert. Nach 4, 24, 48 und 72h wurde, wie folgt unter b) beschrieben, das Produkt der DAB-Reduktion, 4-(N,N-Dimethylamino)anilin, extrahiert und an Fluorescamin gekuppelt und vermessen.

###### **b) Einsatz von Induktoren und Inhibitoren**

Wenn die Konfluenz des Zellrasens ca. 90% erreichte, begannen die Versuche mit der Zugabe der Induktoren in 10 Wells. Auf ihre induktive Wirkung wurden Clofibrat (300 $\mu$ M) und 3-MC (2 $\mu$ M) untersucht. Gleichzeitig erhielten 5 Wells frisches, farbloses Medium, diese Wells dienten als Kontrolle. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten konnten alle Lösungen entfernt und der Hälfte der induzierten Proben die potentiellen Inhibitoren Metyrapon (1 $\mu$ M) bzw.  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) zugegeben werden. Es folgte sofort darauf die Zugabe von DAB zu allen

Proben, die Endkonzentration je Well betrug 200 $\mu$ M.

Die eben genannten Konzentrationen bezeichnen die Endkonzentrationen in der Probe. Für die Inhibitoren bedeutet dies, es wurde mit je 500 $\mu$ l Metyrapon (2 $\mu$ M) bzw.  $\alpha$ -NP (2 $\mu$ M) und zusätzlich 500 $\mu$ l DAB (400 $\mu$ M) gearbeitet. In alle anderen Wells wurde 1ml DAB (200 $\mu$ M) pipettiert. Die Belegung der 24-Well-Platten erfolgte analog dem Schema Nr. 2 unter Kapitel 4.3.2.3 a. Die Induktionszeiten variierten zwischen 4, 24, 48 und 72 Stunden. Auch die Zeitabhängigkeit der DAB- Umsetzung sowie die einer möglichen Hemmung wurden untersucht, dabei betragen die Zeiten ebenfalls 4, 24, 48 und 72 Stunden.

Nach Ablauf der Umsetzungszeit wurden jedem Well 500 $\mu$ l Lösung entnommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zur Beendigung der Reaktion jeweils 100 $\mu$ l Natriumhydroxid (0,5 M) zugesetzt. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit je 500 $\mu$ l Heptan. Dabei wurden die Proben kurz auf dem Vortexer durchmischt (ca. 30 Sekunden) und anschließend zentrifugiert (1 Minute, 4000 x g), um eine klaren Phasentrennung zu erreichen. Die beiden so gewonnenen Heptanphasen wurden vereinigt, die wässrigen Phasen verworfen. Für die Kupplung mit Fluorescamin wurde das 4-(N,N-Dimethylamino)anilin aus der organischen Phase in eine wässrige überführt. Dies geschah mit je 1,0 ml Essigsäure- Natriumacetatpuffer (0,1 M) pH 4,0, unter den oben genannten Bedingungen der Durchmischung und Zentrifugation. Die wässrigen Proben wurden nun analog dem Ausgangsschema in eine 24-Well-MTP überführt, die Kalibrierlösungen in die dafür vorgesehenen leeren Wells pipettiert und allen Wells je 50 $\mu$ l Fluorescaminlösung (1,5 mM) zugesetzt. Unter Lichtausschluss konnte die Kupplungsreaktion ablaufen. Zur Vergleichbarkeit aller Untersuchungen geschah dies immer über einen konstanten Zeitraum von 30 Minuten. Die Vermessung der Fluoreszenz des Produktes erfolgte bei Raumtemperatur analog dem Kapitel 4.3.4.2.

Die Platten mit den HaCaT- Zellen konnten der BioRad- Proteinbestimmung zugeführt werden (siehe Kapitel 4.4).

#### **4.4 BioRad- Proteinbestimmung**

Der BioRad- Assay ist ein kommerzielles Produkt der Bio-Rad Laboratories GmbH und beruht auf der Färbemethode nach Bradford. Um die im Zellverband gebundenen Proteine aufzuschließen, wurden am Ende eines jeden Versuches sämtliche Lösungen entfernt, mit PBS gespült und anschließend die Zellen mit 500 $\mu$ l Aqua purificata je Well in einem doppelten Zyklus bei mindestens -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Durch das Spülen wurden bei der Proteinbestimmung keine im Medium gelösten Proteine erfasst. Ebenso sollten keine Proteine aus toten Zellen mit bestimmt werden, da bei adhären wachsenden Zellkulturen die abgestorbenen Zellen sich zumeist vom Boden lösen und beim Spülen gleichfalls entfernt werden. Jedoch werden Proteine aus geschädigten und toten Zellen, die sich nicht vom Zellrasen gelöst haben, mitbestimmt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension aus den 24-well Platten in Eppendorf- Reaktionsgefäße überführt, mit je 500 $\mu$ l/well Triton X100 0,1% die Platten gespült und beide Suspensionen in den Reaktionsgefäßen vereinigt. Der Zusatz von Triton in einer Endkonzentration von 0,05% verbesserte die Zerstörung der Zellmembranen und machte

die membrangebundenen Proteinen der Bestimmung zugänglich, ohne die Bradford- Bestimmung zu beeinträchtigen. Nach Homogenisieren mittels Vortexer, Abzentrifugieren der Zellfragmente (4000g / 15min / 10°C) erfolgte mit dem Überstand die Proteinbestimmung. Dafür wurden je 20µl Probe als Dreifachbestimmung in einer Rotilabo-96-Well-Mikrotiterplatte mit 180µl Bradford- Reagens (zuvor 1:4 verdünnt) versetzt. Parallel erfolgte jeweils in der gleichen Platte die Aufnahme einer Kalibriergeraden von BSA als Standardprotein. Die Konzentrationen der Kalibriergeraden betragen 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 500µg/ml BSA in TritonX100 0,05%. Nach 5 bis 10 min bei Raumtemperatur konnte die Absorption des gebildeten Farbstoffkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Diese Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Produktbeschreibung. [156]

#### 4.5 UV-Exposition

Der Einsatz einer speziellen Bestrahlungskammer [72;144;158], erlaubte die getrennte Bestrahlung mit UVA oder UVB- Licht bei jeweilig genauer Dosiserfassung. Im Kapitel 4.10 sind die Teile dieser Kammer bezeichnet, eine Skizze findet sich bei Radschuweit, A. [158].

Da die Zellen vor und nach der Bestrahlung steril inkubiert wurden, sollte auch in der Bestrahlungskammer eine keimarme Atmosphäre herrschen. Dazu wurde die Kammer vor jeder Benutzung gründlich mit Ethanol 70% desinfiziert. Die Deckel der MTP waren UV-undurchlässig und mussten unmittelbar vor der Bestrahlung abgenommen und gegen desinfizierte Quarzplatten ausgetauscht werden. Eine Bestrahlung ohne Abdeckung wurde unbedingt vermieden, da die längste Bestrahlungszeit knapp 50 min währte und dies neben der Kontaminationsgefahr auch die Verdunstung der Pufferlösung zu stark erhöht hätte. Die Distanz zwischen den UV-Lampen und den bestrahlten Proben lag konstant bei 18 cm.

##### 4.5.1 UVA

In der Bestrahlungskammer befanden sich für die UVA- Bestrahlung CLEO Performance R UVA- Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 305 - 420 nm. Es wurden ausschließlich Versuche mit Zellen in 24-Well-MTP durchgeführt. Vor jeder Bestrahlung erfolgte der Austausch des Kulturmediums gegen 500µl PBS- Lösung (37°C, pH 7,4), um eventuell auftretende, die Versuche überlagernde Reaktionen mit Mediumbestandteilen auszuschließen. Zur Bestrahlung kamen 1; 8 und 16 J/cm<sup>2</sup> zum Einsatz. Dies entsprach laut Radschuweit [158] dem Aufenthalt im Freien an einem sonnigen, wolkenfreien Sommertag von ca. 5 min; 30-45 min und 55-90 min, so dass die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen mit den gewählten Bestrahlungszeiten durchaus für den mitteleuropäischen Raum als praxisrelevant angesehen werden können. Zur genauen Dosiserfassung der Strahlung befand sich in der Kammer unmittelbar neben den Platten ein UVA- Sensor.

Anschließend an die Bestrahlung wurden unter der Laminar- Flow- Box die PBS- Lösungen gegen jeweils 1ml farbloses Medium (37°C) getauscht und für 24h im Brutschrank inkubiert, um auch Zeitverzögerte Effekte der Bestrahlung mit erfassen zu können. Eine wiederholte Bestrahlung derselben Zellprobe fand nicht statt.

## 4.5.2 UVB

Für die UVB- Bestrahlung befanden sich CLEO Performance TL UVB-Leuchtstoffröhren mit einem Emissionsspektrum von 280- 350 nm in der Bestrahlungskammer. Die Bestrahlungsvorbereitung erfolgte analog der UVA- Bestrahlung in Kapitel 4.5.1. Bestrahlt wurde im UVB- Bereich mit 25 und 50mJ/cm<sup>2</sup>. Anschließend an die Bestrahlung wurden die Pufferlösungen gegen Medium ersetzt und 24h inkubiert. Die Inkubation von 24h ergab sich aus den Veröffentlichungen von Mammone, T. [121] und Henseleit, U. [83], wobei von Henseleit verschiedene Zeiten nach der Bestrahlung die DNA- Fragmentation untersucht wurde und sich nach 24h die größten Mengen an DNA- Fragmenten fanden.

Da in der verwendeten Literatur keine vergleichenden Aussagen zu Strahlungsdosis und natürlicher UVB- Belastung angegeben waren, wurde dieser Versuch selbst durchgeführt.

### 4.5.2.1 Vergleich von natürlichem mit künstlichem UVB- Licht

Zum Vergleich der künstlichen mit der natürlichen UVB-Strahlung wurde an einem sonnigen, wolkenlosen Sommertag ermittelt, in welcher Zeit 25; 50 bzw. 100mJ/cm<sup>2</sup> auf der Erde aufzutreffen. Dazu wurde der in der Bestrahlungskammer verwendete Sensor für UVB (Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach, DL) zu drei verschiedenen Uhrzeiten der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt und die Zeit bis zum Erreichen der angegebenen UVB- Dosen notiert. Ein zweites Mal erfolgte diese Bestimmung an einem meteorologisch als heiter bezeichnetem Sommertag, genau zur gleichen Uhrzeit, wie zuvor. Es herrschte weitgehend Sonnenschein nur einige wenige Wolken waren am Himmel. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Bestrahlungszeit für die gleichen UV- Dosen in der Kammer gemessen.

Auch bei der UVB- Bestrahlung wurde keine der Zellproben einer wiederholten Strahlung ausgesetzt.

## 4.6 Statistik

Die Versuche wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm SD$ ) von  $n$  unabhängigen Experimenten berechnet. Für alle Experimente wurden Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen verwendet. Unterschiede zwischen zwei einzelnen Versuchsgruppen wurden unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  mittels des t-Tests nach Student für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgend Bonferoni's multipler Vergleichstest angewendet. Als signifikant galten p-Werte für  $\alpha \leq 0,05$ .

#### 4.7 Medien, Supplemente und sonstige Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) <i>mit</i> Phenolrot	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, DL Kat.- Nr.: 21969
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) <i>ohne</i> Phenolrot	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, DL Kat.- Nr.: 31053
Fötale Kälberserum (FKS) (Foetal Bovine Serum) South American	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, DL Kat.- Nr.: 10270
Gentamicin-L-Glutamin-Lösung (5mg Gentamicin, 200mM L-Glutamin pro ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DL Kat.- Nr.: G-9654
Natriumpyruvat, 100mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DL Kat.- Nr.: S-8636
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
PBS (w/o Ca and Mg)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, DL
Trypsin-EDTA (w/o Ca and Mg)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, DL

Eigene Bezeichnung und Zusammensetzung der gebrauchsfertigen Medien:

Medium A	Medium B	Medium C	Medium D
DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
21969	31053	21969	31053
mit Phenolrot	ohne Phenolrot	mit Phenolrot	ohne Phenolrot
10% FKS	10% FKS	5% FKS	5% FKS

Medium B<sub>alk</sub>: 3 Teile Medium B und 1 Teil Glycinpuffer (pH 10,4)

#### 4.8 Chemikalien

2- $\alpha$ -OH-Testosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
3-Methylcholanthren	Ferak Berlin, DL
4-Androsten-3,17-Dion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
4-(N,N-Dimethylamino)azobenzene (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
4-(N,N-Dimethylamino)anilin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
6- $\beta$ -OH-Testosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
7-Ethoxycoumarin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
7-Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Acetatpuffer pH 4,5	Sigma Diagnost. Chemie GmbH, St.Louis, USA
Aceton, wasserfrei	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Ameisensäure, konz.	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Aqua purifikata (zur HPLC)	per Ionenaustauschanlage zubereitet
Bovine Plasma Albumin-Standard	Bio-Rad Protein Assay Kit II, Kat.-Nr.:500-0002
+ Coomassie Blau-Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DL
CasyTon	Schärfe System, Reutlingen, DL
Clofibrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DL
Dimethylsulfoxid, reinst	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Dulbecco's PBS (DPBS unsteril)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Essigsäure 30% (V/V) (Eisessig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DL
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DL

Ethylendiamintetraacetat-Tetranatrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Fluorescamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
$\beta$ -Glucuronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
500000 units (348100u/g; DMSO)	
Glycinpuffer pH 10,4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Heptan	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Isopropanol (HPLC-geeignet)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DL
Methanol für HPLC	Merck KgaA, Darmstadt, DL
3-Methylcholanthren	Ferak Berlin, DL
Metyrapon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
od.: Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DL
$\alpha$ -Naphthoflavin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Natriumhydroxid	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Neutralrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Phenobarbital	AM-Werk Dresden, DL
Proadifenhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Resorufin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Salzsäurelösung, 0,1N	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Siliconöl	Merck KgaA, Darmstadt, DL
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, DL
TAO (Triacetyloleandomycin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Testosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL
Triton X100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DL

#### 4.9 Verwendete Lösungen

2 $\alpha$ -OH-Testosteron-Stlsg. 10mM	0,005 g 2 $\alpha$ -OH-T zu 1,643 ml DMSO
3-Methylcholanthren-Stlsg. 100mM	0,2684 g 3-MC zu 10,0 ml DMSO
4-Androsten-3,17-Dion-Stlsg. 100mM	0,1432 g Andro zu 5,0 ml DMSO
4-(N,N-Dimethylamino)azobenzene-Stlsg. 100mM	0,253 g DAB zu 10,0 ml DMSO
4-(N,N-Dimethylamino)anilin-Stlsg. 100mM	0,1362g 4-(N,N-Dimethylamino)anilin zu 10,0ml DMSO
6 $\beta$ -OH-Testosteron-Stlsg. 10mM	0,005 g 6 $\beta$ -OH-T zu 1,643 ml DMSO
7-Ethoxycoumarin-Stlsg. 100mM	0,1902 g 7-EC zu 10,0 ml DMSO
7-Ethoxyresorufin-Stlsg. 10mM	1,0mg 7-ER auf 414,6 $\mu$ l DMSO
7-Hydroxycoumarin (=Umbelliferon)-Stlsg. 50mM	0,0811 g zu 10,0ml DMSO
Bradford- Reagenz (Bio-Rad-Assay)	4,0 ml Coomassie Blau-Farbstoffkonzentrat zu 20,0ml A.p.
Clofibrat-Stlsg. 88,46mM	0,2147 g Clofibrat zu 10,0 ml DMSO
Dexamethason-Stlsg. 10mM	0,0196 g Dexamethason zu 5,0 ml DMSO
Essigsäure 0,2M	4,0 ml Essigsäure 30% (V/V) zu 100,0 ml A.p.
Essigsäure-Natriumacetat-Puffer 0,1M (pH 4,0)	18,0 ml Natriumacetattrihydratlsg. zu 100,0 ml Essigsäure 0,2 M
Ethanol/ Eisessig- Lsg. für NR	50,0 ml Ethanol, 1ml Eisessig zu 100,0 ml A.p.
Fluorescaminlsg. 1,5mM	0,0208 g Fluorescamin zu 50,0 ml Aceton, wf

$\beta$ -Glucuronidase-Stlsg. (10000 units/ml)	0,00287 ml $\beta$ -Glucuronidase-Sulfatase-lsg. (348100 u/g; DMSO) zu 1,0ml Essigsäure-Natrium-acetatpuffer pH 4,5
$\beta$ -Glucuronidaselsg., (1000 units/ml)	0,00287 ml $\beta$ -Glucuronidase-Sulfatase-lsg. (348100 u/g; DMSO) zu 10,0ml Essigsäure-Natriumacetatpuffer pH 4,5
$\beta$ -Glucuronidaselsg., (20 units/ml)	10 $\mu$ l $\beta$ -Glucuronidase-Stlsg. zu 5,0 ml Natriumacetat puffer pH 4,5
$\beta$ -Glucuronidaselsg., (0,04 units/ml)	10 $\mu$ l $\beta$ -Glucuronidaselsg. (20 u/ml) zu 5,0 ml Natriumacetatpuffer pH 4,5
Metyrapon-Stlsg. 100mM	0,2268 g Metyrapon zu 10,0 ml DMSO
MTT-Reagenz	5,0 mg/ml MTT in PBS (steril filtriert)
MTT-Lösepuffer	20,0 ml Eisessig; 10,0 g SDS und 80,0 ml DMSO
$\alpha$ -Naphthoflavon-Stlsg. 2mM	2,1784 g $\alpha$ -Naphthoflavon zu 4,0 ml DMSO
Natriumacetattri-hydratlsg.	2,72g Natriumacetattri-hydrat zu 100,0 ml A.p.
Natriumhydroxid (0,5 M)	0,1999 g NaOH zu 10,0 ml A.p.
Neutralrotlsg.	5 mg Neutralrot zu 100,0ml DMEM (farblos), ggf. vor Verwendung filtrieren
Phenobarbital-Stlsg. 1M	2,3224 g Phenobarbital zu 10,0 ml DMSO
Proadifen-Stlsg. 50mM	0,0195 g Proadifen zu 1,0 ml DMSO
Resorufin-Stlsg. 10mM	0,0235 g Resorufin zu 10,0 ml DMSO
Rifampicin-Stlsg. 100mM	0,4115 g Rifampicin zu 5,0 ml DMSO
TAO-Stlsg. 500mM	0,8140 g TAO zu 2,0 ml DMSO
Testosteron-Stlsg. 100mM	0,2884 g zu 10,0 ml DMSO
Triton X100 0,1%	100 $\mu$ l Triton X100 zu 100,0 ml A.p.

#### 4.10 Geräte

Analysenwaage	Scal Tec, SAC 63
Bestrahlungskammer mit:	Eigenbau FB Pharmazie, MLU-Halle, Halle, DL
◦ CLEO Performance R UVA- bzw.	Veith Import-Export, Westerau, DL
◦ CLEO Performance TL UVB- Leuchtstoffröhren	-  -
◦ UVA- bzw. UVB-Sensor	Kühnast Strahlungstechnik, Wächtersbach, DL
◦ Quarzplatten 8,5 x 8,5 cm	QVF Labortechnik GmbH, Ilmenau
Brutschrank I	WTC Binder, Tutlingen, DL
Brutschrank II	Heraeus Laborgeräte AG, Zürich, Schweiz
Geräte für die Zellkultur (steril):	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, DL
Auslaufpipetten, 10ml, 25ml, 50ml	-  -
Gewebekulturflaschen, 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup>	cellstar -  -
Gewebekulturplatten, 6-Well, 24-Well,	cellstar -  -
Mikrotiterplatten, 96-Well, F-Form	cellstar -  -
PP-Röhrchen, 15ml, 50ml	-  -
Zellschaber	cellscrapper -  -
Geräte für die Zellkultur (unsteril, vor Gebrauch sterilisiert):	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, DL
◦ Eppendorfspitzen, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l,	-  -
5ml	-  -
◦ Reaktionsgefäße- Eppendorf- Tubes	-  -
◦ Pasteurpipetten	CarlRoth GmbH, Karlsruhe, DL

HPLC- Anlage:	Merck- Hitachi
◦ Solvent Degaser L7612	
◦ Pumpe L7100	
◦ Autosampler L7200	
◦ Column Oven L7360	
◦ Diodenarraydetektor L7455	
◦ PC	Compaq
◦ Software: D7000 HSM von 1999	Merck KgaA, DL
HPLC- Zubehör:	
◦ Säule: LiChroCART 250-4;	Merck KgaA, DL
LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ M)	
◦ Vorsäule: LiChroCART 4-4;	Merck KgaA, DL
LiChrospher 100 RP-8 (5 $\mu$ M)	
◦ 1,5 ml Vials mit 0,1ml Mikroinsert und Silicon- Septen	Merck KgaA, DL
Mikroskope:	
◦ Lichtmikroskop Axiovert 25,	Carl-Zeiss, Jena, DL
◦ Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop, Typ CK 40 RFL	Olympus, Hamburg, DL
◦ Mikroskopkamera, CamediaC-3030zoom + Software Olympus DP-Soft	Olympus, Hamburg, DL
pH- Meter	Mettler- Toledo GmbH, Steinbach, DL
Pipetten, Mikroliterpipetten Versch. Größen und Modelle z.B. Eppendorf Research pro	Eppendorf- Netheler GmbH, Hamburg, DL
Plattenreader Polystar Galaxy (zur Fluoreszenz-/Absorptionsbestimmung)	BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg, DL
Plattenschüttler incl. Inkubator	Heidolph Titramax 1090, Heidolph Instruments GmbH & CO KG, BT221 S, Sartorius AG Göttingen, DL
Präzisionswaage	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DL
Rotilabo, Mikrotiterplatten, 96-Well ◦ Unsteril, U-Form, ohne Deckel	
Spekol 1200	Carl-Zeiss Technologie, Jena, DL
Spektrophotometer	Perkin- Elmer MPF-44,
Sterilbank I Hera safe H S9,	Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau, DL
Sterilbank II SKANAIR, Vertikal Flow,	SKANAG, Basel, Schweiz
Ultraschallbad RK52H,	Bandelinsonorex, electronic Berlin, DL
Vakuumsystem BVC 21, ◦ (Pumpe und Vacuu Hand Controll)	Vacuubrand GmbH & CO KG, Wertheim, DL
Vortexer:	
◦ Typ KM S2	Wilmington, USA
◦ MS2 Minishaker IKA	IKA; Wilmington, USA
Zellzähler: Casy1	
◦ Cellcounter & Analyser System	Schärfe System, Reutlingen, DL
Zentrifuge (Eppendorf- Zentrifuge)	
◦ Typ 5804 R,	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, DL

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Wachstumsverhalten

Zu Beginn der Untersuchungen sollte festgestellt werden, welchen Einfluss eine unterschiedliche Supplementierung des Mediums mit Fötalem Kälberserum (FKS) auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellkultur hat. Außerdem wurde untersucht, ob es Unterschiede im Wachstum zwischen Medium mit Phenolrot und ohne Phenolrot gibt. Des Weiteren erfolgten Versuche mit unterschiedlicher Zellzahl bei der Aussaat.

#### 5.1.1 Wachstumsverhalten ohne regelmäßigen Wechsel des Mediums

Für die Viabilitätsassays war es notwendig, zu untersuchen, wie sich die HaCaT- Zellen unter längeren Versuchsbedingungen ohne Wechsel des Mediums verhalten. Da zum Teil das Phenolrot des Mediums bei photometrischen Vermessungen stört, kamen zwei Medien zum Einsatz: DMEM *mit* Phenolrot (Gibco-Nr.21969) und DMEM *ohne* Phenolrot (Gibco-Nr.31053) Beiden Medien wurde vor Gebrauch Gentamicin und L-Glutamin zugesetzt. Das im Medium mit Phenolrot enthaltene Natriumpyruvat musste dem Medium ohne Phenolrot vor Gebrauch noch zugesetzt werden. Für diesen Wachstumsversuch wurden die Medien unterschiedlich mit FKS supplementiert, zum einen mit 5% FKS und zum anderen mit 10% FKS, so dass vier zu testende Medien resultierten:

DMEM 21969 Mit Phenolrot 10% FKS	DMEM 31053 ohne Phenolrot 10% FKS	DMEM 21969 mit Phenolrot 5% FKS	DMEM 31053 ohne Phenolrot 5% FKS
---	--	--	---

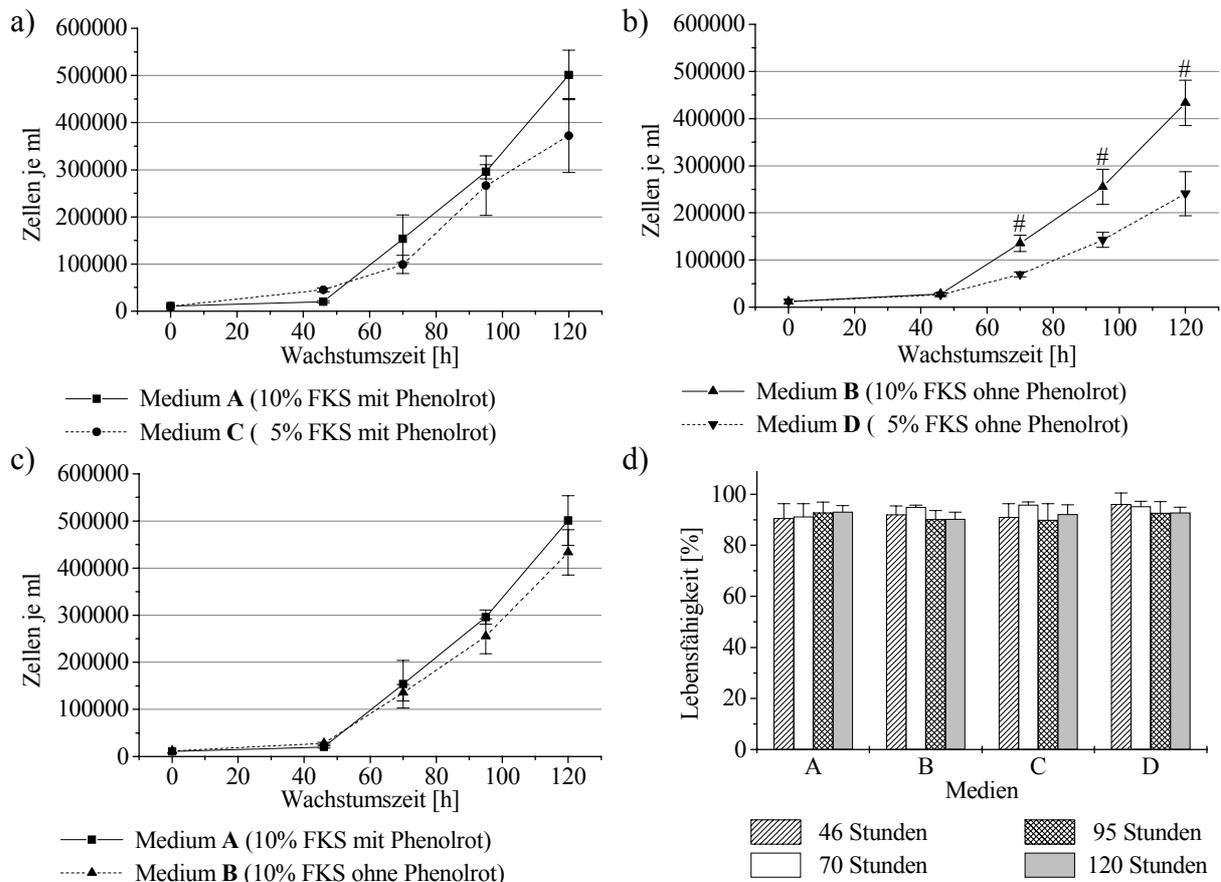
Im Weiteren bezeichnet als:

Medium <b>A</b>	Medium <b>B</b>	Medium <b>C</b>	Medium <b>D</b>
-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Zu Versuchsbeginn wurden Zellsuspensionen einer Passage 59 (künftig kurz P59) auf ca.  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Zellen / ml eingestellt und im Anschluss mittels CASY- Zellzählgerät genau bestimmt. Die Aussaat aller HaCaT- Zellen erfolgte in Medium A bzw. B in mehrere 24-Well- Platten. Um den Zellen Zeit zum Anwachsen zu geben, wurde erst nach 24 h in den entsprechenden Wells auf Medium C und D umgestellt und die Medien A und B das einzige mal erneuert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Zellzahl erneut bestimmt, indem erst das Medium entfernt, mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin die Zellen vom Gefäßboden gelöst wurden. Da Trypsin die Zellen schädigt, wurde sofort nach Ablösung der Zellen die Trypsin- Suspension durch Zugabe von Medium gestoppt. Die nun resultierende Suspension konnte am CASY- Zellzählgerät vermessen werden, dabei wurde sowohl die Gesamtzellzahl als auch der Anteil der toten Zellen ermittelt, um Aussagen zur Lebensfähigkeit treffen zu können. Die folgenden Abbildungen 5.1.1 zeigen die ermittelten Wachstumskurven.

Aus Abb. 5.1.1 a) und b), wie auch aus Abb. 5.1.2 a) und b) ist erkennbar, dass die Supplementierung mit nur 5% FKS gegenüber 10% FKS zu deutlich verzögertem Wachstum der Keratinozytenzellkultur führte. Besonders wirkte sich dies in der exponentiellen Wachstumspha-

se aus. Außerdem wird aus den Abbildungen 5.1.1 c) und 5.1.2 c) deutlich, dass die Verwendung von Medium mit oder ohne Phenolrot keinen Einfluss auf den Wachstumsverlauf hat.



**Abb. 5.1.1:** Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medienwechsel nach 24h; Zellzahl bei Aussaat ca.  $1 \times 10^4$  Zellen/ml

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,05 \times 10^4$  Zellen/ml für Medium A und C und  $1,16 \times 10^4$  Zellen/ml für Medium B und D. Die Konfluenz lag zu Ende des Versuches bei ca. 90%.

a) Supplementierung von Phenolrothaltigem Medium mit 5% bzw. 10% FKS

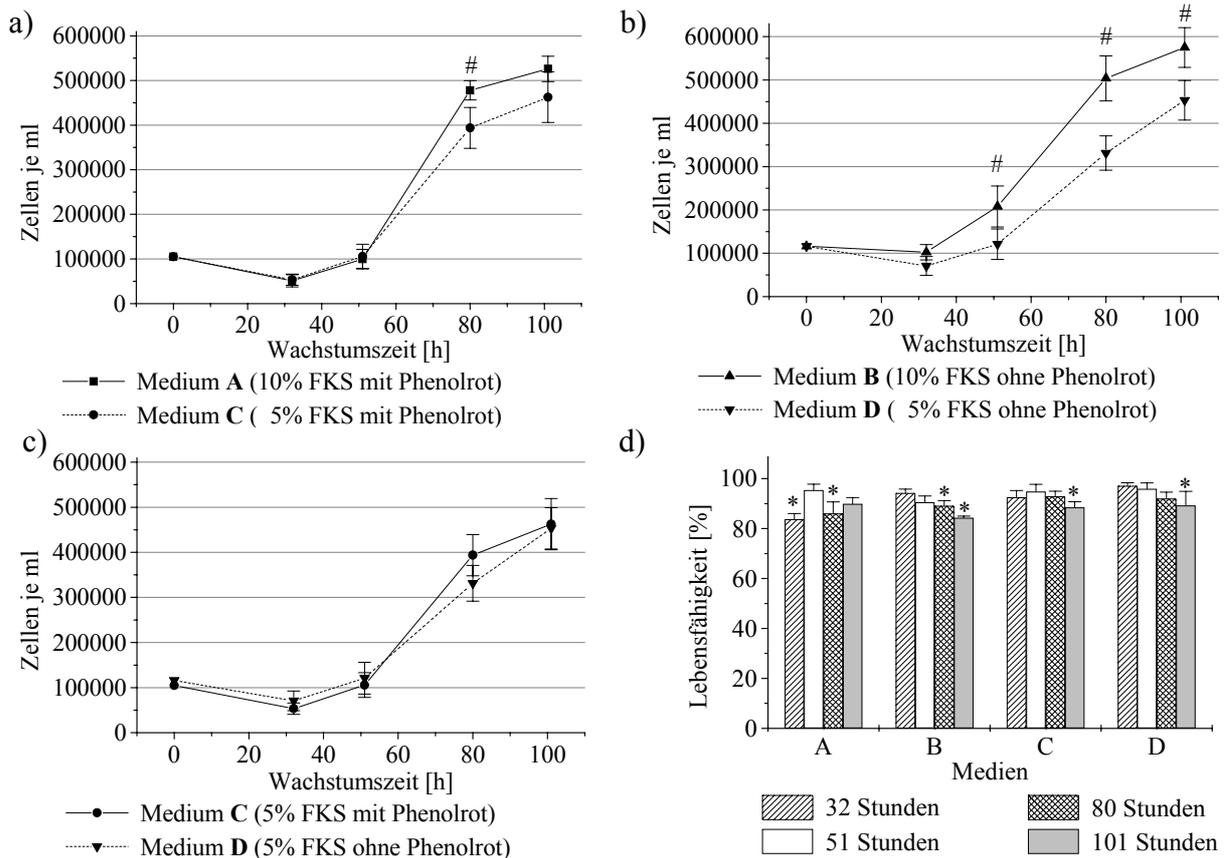
b) Supplementierung von Phenolrotfreiem Medium mit 5% bzw. 10% FKS

c) Vergleich von Phenolrothaltigem Medium mit Phenolrotfreiem Medium bei gleichem Gehalt an FKS

d) Darstellung der Viabilität in den untersuchten Medien unter Einfluss der Wachstumszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten,  $^{\#}p < 0,05$ ; t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

Hinsichtlich der Lebensfähigkeit kann festgestellt werden, dass die vier verwendeten Medien keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Die merkliche Abnahme der Viabilität mit zunehmender Wachstumszeit bei höherer Ausgangszellzahl (Abb. 5.1.2 d) lässt sich hauptsächlich mit dem Aufbrauchen des Mediums erklären. Schon nach 80 Stunden ohne weiteren Mediumwechsel war ein pH-Wert-Abfall in den sauren Bereich durch Umschlagen des Phenolrots über orange nach gelb ersichtlich. Damit geht zumeist ein Nährstoffmangel, wie auch die Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte einher. Für den Zellzyklus bedeutet dies einen Übergang in die stationäre Phase bis hin zur Regressions- oder Absterbephase. Die Proliferationsphasen der HaCaT- Zellkultur sind anhand schematischer Darstellung und einer P34 in Abb. 5.1.3 dargestellt. Sie entsprechen den allgemeinen Phasen etablierter Zelllinien in Kultur.



**Abb. 5.1.2:** Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medienwechsel nach 24h; Zellzahl bei Aussaat ca.  $1 \times 10^5$  Zellen/ml

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,05 \times 10^5$  Zellen/ml für Medium A und C und  $1,16 \times 10^5$  Zellen/ml für Medium B und D. Die Konfluenz lag zu Ende des Versuches bei 100%.

a) Supplementierung von Phenolrothaltigem Medium mit 5% bzw. 10% FKS

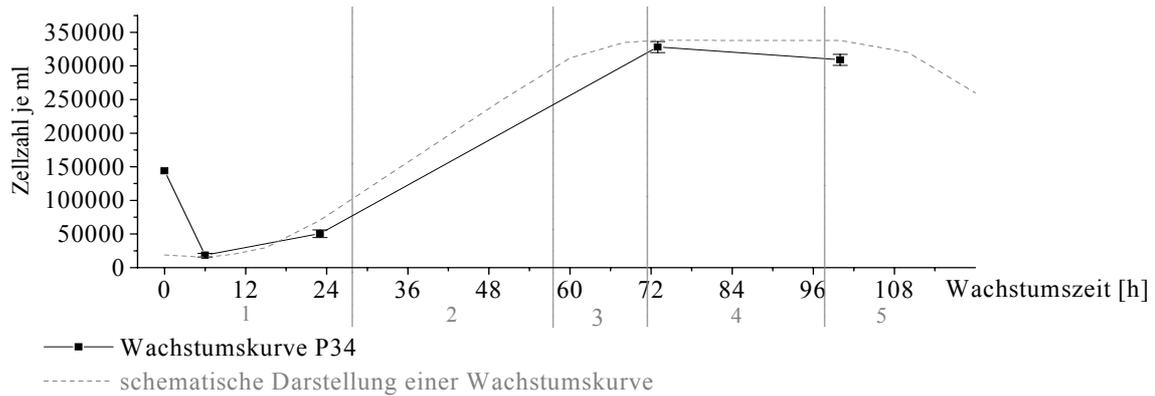
b) Supplementierung von Phenolrotfreiem Medium mit 5% bzw. 10% FKS

c) Vergleich von Phenolrothaltigem Medium mit Phenolrotfreiem Medium bei gleichem Gehalt an FKS

d) Darstellung der Viabilität in den untersuchten Medien unter Einfluss der Wachstumszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten, # $p < 0,05$ , t-Test nach Student für unverbundene Stichproben; \* $p < 0,05$  gegenüber der maximalen Lebensfähigkeit für das jeweilige Medium, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Sollen also bei Versuchen die HaCaT- Zellen längere Zeiten *ohne* Mediumwechsel inkubiert werden, ist es wichtig, mit einer geringen Ausgangszellzahl zu arbeiten, um die Zellkultur möglichst lange in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten und damit die Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte zu minimieren.



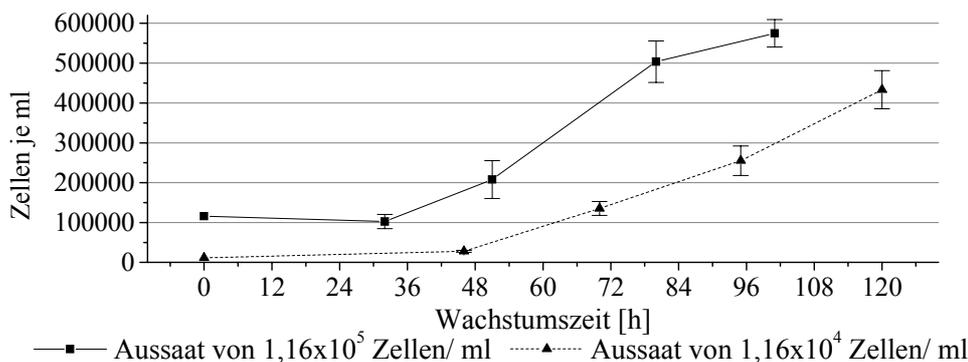
**Abb. 5.1.3:** Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P34, bei einmaligem Mediumwechsel nach 24h und schematische Darstellung der Proliferationsphasen von Zelllinien in Kultur (modifiziert nach A. Wobus in Molekular- und Zellbiologische Grundlagen von D. Ganten und K. Ruckpaul) [67]

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,44 \times 10^5$  Zellen/ml in Medium A. Am Messpunkt 73 h lag die Konfluenz bei 100%. Die eingezeichneten Vertikalen unterteilen die Phasen der Proliferation:

- 1) Latenz- oder lag- Phase – Gewöhnung der Zellen an die Wachstumsbedingungen der Zellkultur
- 2) Exponentielle Wachstumsphase – es finden gleichmäßige Zellteilungen statt
- 3) Verzögerungsphase – die Wachstumsrate nimmt ab, der Zellrasen nähert sich der Konfluenz
- 4) Stationäre- oder Plateauphase – konfluenter Monolayer, durch die Kontakthemmung kommt es zu keiner weiteren Zellvermehrung; Tod und Vermehrung der Zellen stehen im Gleichgewicht
- 5) Regressions- oder Absterbephase – durch Nährstoffmangel und pH- Wert- Abfall (im Beispiel aufgrund fehlenden Mediumwechsels)

Dargestellt sind für P34 die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten

In Abb. 5.1.4 sind die Wachstumskurven für Medium B mit Aussaat von  $10^4$  und  $10^5$  Zellen je ml gegenübergestellt. Daraus ist ersichtlich, welchen Einfluss die Zellzahl bei der Aussaat auf den weiteren Wachstumsverlauf hat. Je nach Problemstellung kann man so steuern, ob mit Zellen gearbeitet wird, die sich im exponentiellen Wachstum befinden oder eher mit Zellen in der Plateauphase, die bereits einen konfluenten Monolayer gebildet haben.



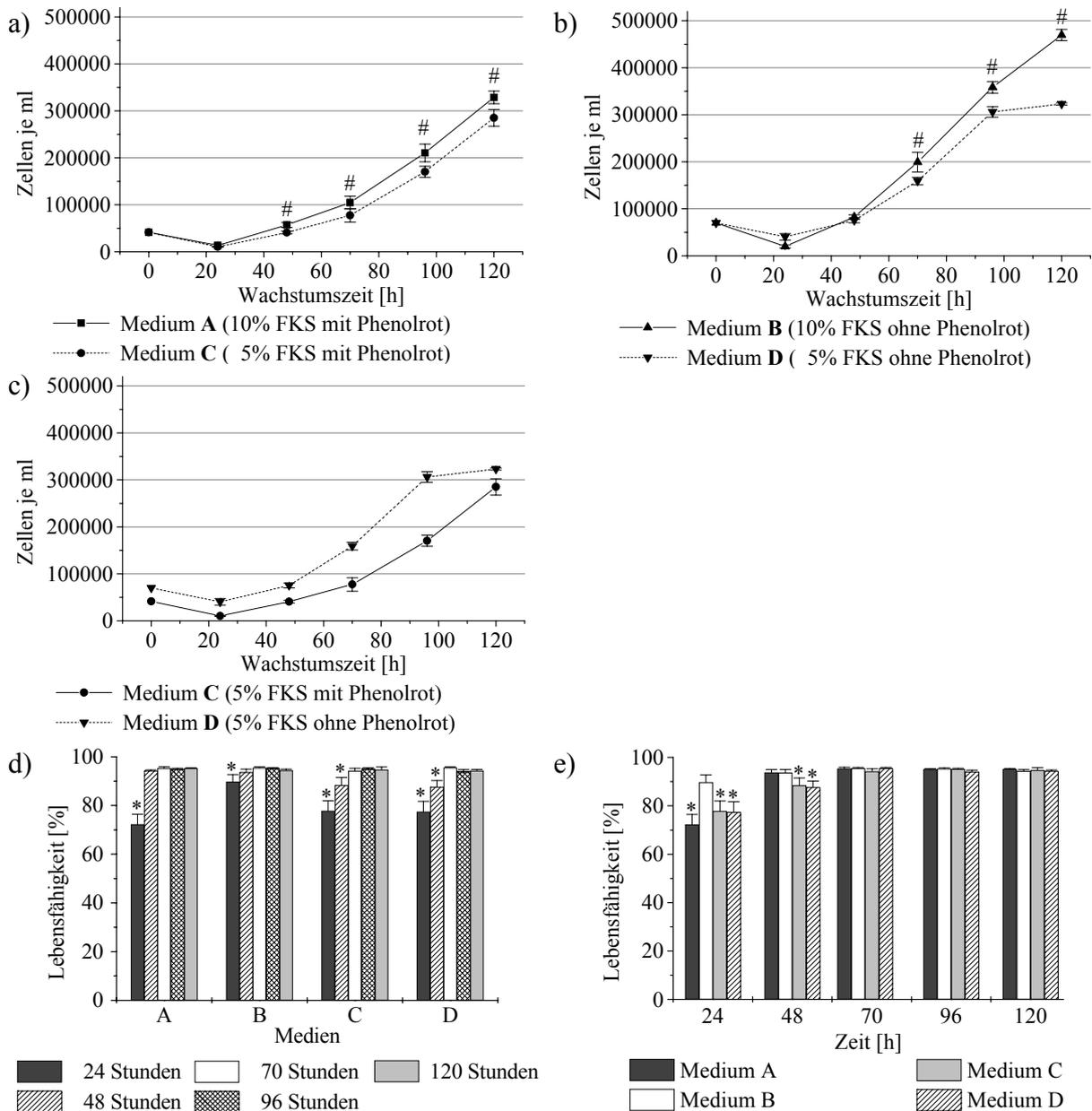
**Abb. 5.1.4:** Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medienwechsel nach 24h; Vergleich unterschiedlicher Zelldichten bei der Aussaat

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,16 \times 10^4$  Zellen/ml oder  $1,16 \times 10^5$  Zellen/ml in Medium B. Die Konfluenz lag für die höhere Aussaatdichte zu Versuchsende bei 100%. Bei Aussaat von  $1,16 \times 10^4$  Zellen/ml wurde nach 120 h eine Konfluenz von ca. 90% erreicht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten

### 5.1.2 Wachstumsverhalten mit Wechsel des Mediums nach je 24 Stunden

Die Durchführung dieses Versuches ähnelte dem Vorangegangenen, so kamen die gleichen Medien zum Einsatz. Gearbeitet wurde mit einer P70, deren Zellsuspension auf  $5 \times 10^4$  Zellen / ml eingestellt wurde. Die Aussaat der HaCaT- Zellen erfolgte wieder in Medium A bzw. B in

mehrere 24-Well-Platten. Der Wechsel auf die Medien C und D erfolgte hier schon nach 6 h. Beginnend vom Zeitpunkt der Zellaussaat wurden die alten Medien alle 24 Stunden abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. In Anlehnung an die bereits durchgeführten Untersuchungen wurde der Versuch nach 120 Stunden abgebrochen. Die ermittelten Wachstumskurven und die dazugehörige Viabilität sind im Anhang in den Abb. 5.1.5 a-e dargestellt.



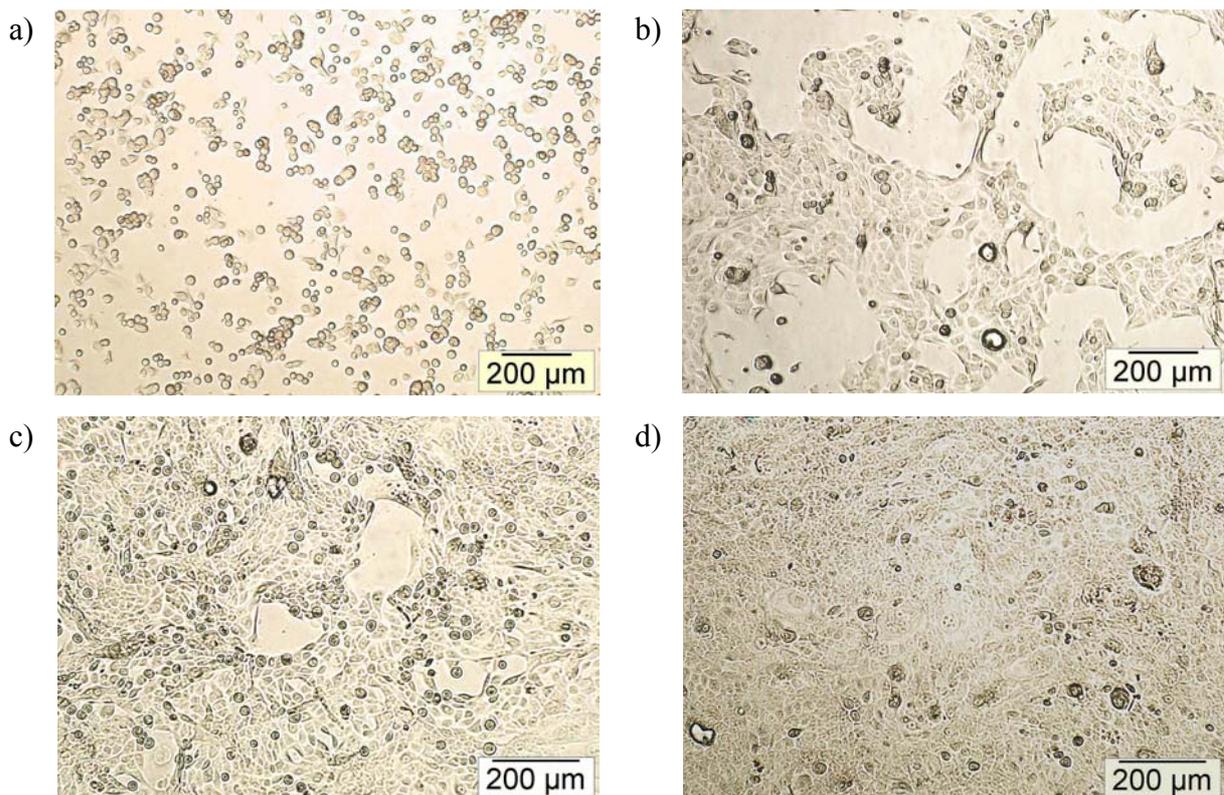
**Abb. 5.1.5:** Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P70, bei Mediumwechsel alle 24h. Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $4,15 \times 10^4$  Zellen/ml für Medium A und C und  $7,01 \times 10^4$  Zellen/ml für Medium B und D. Die Konfluenz lag zu Ende des Versuches bei 95% in den Medien A und C, sowie bei 100% in den Medien B und D.

- Supplementierung von Phenolrothaltigem Medium mit 5% bzw. 10% FKS
- Supplementierung von Phenolrotfreiem Medium mit 5% bzw. 10% FKS
- Vergleich von Phenolrothaltigem Medium mit Phenolrotfreiem Medium bei gleichem Gehalt an FKS
- Darstellung der Viabilität in Abhängigkeit von den untersuchten Medien
- Darstellung der Viabilität in Abhängigkeit von der Wachstumszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten, # $p < 0,05$ , t-Test nach Student für unverbundene Stichproben; \* $p < 0,05$  gegenüber der maximalen Lebensfähigkeit für das jeweilige Medium bzw. die jeweilige Zeit, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Auch bei diesem Versuch war das Medium mit 5% FKS dem 10%igen FKS- Zusatz signifikant unterlegen. Ein statistischer Vergleich der Medien mit und ohne Phenolrot bei gleicher Supplementierung mit Serum war hier nicht möglich, da sich die Zellzahl bereits bei der Aussaat zu stark unterschied. Auffällig ist die geringe Lebensfähigkeit der Zellen nach 24 Stunden, die mit längerer Kultivierungsdauer wieder zunahm. Zu erklären ist dies mit dem ersten frühen Mediumwechsel nach 6 Stunden. Offensichtlich hatten sich zu diesem Zeitpunkt die Zellen noch nicht ausreichend an die Wachstumsbedingungen gewöhnt, so dass beim Wechsel des Mediums die Zellen zwar noch im Well haften bleiben, aber ihre Adaption an die Umgebungsbedingungen derart gestört wurde, das ein großer Teil der HaCaT- Keratinozyten abstarb. Hier wird ebenso der Vorteil eines höheren Serumgehaltes deutlich, denn bereits nach 48 Stunden wich die Lebensfähigkeit in den Medien A und B (mit jeweils 10% FKS) nicht mehr signifikant von der durchschnittlichen Lebensfähigkeit ab, dagegen erreichten die Medien C und D (mit 5% FKS) dies erst nach 70 Stunden.

Die Abbildung 5.1.6 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen des Wachstums von HaCaT-Keratinozyten einer Passage 39, bei denen nur ein Mediumwechsel nach 48 Stunden erfolgte. Die durchschnittliche Größe einer HaCaT- Zelle liegt bei ca.  $15\mu\text{M}$ .



**Abb. 5.1.6:** Phasen der Ausbildung einer HaCaT- Monolayerschicht, P39

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,27 \times 10^5$  Zellen/ml in Medium A. Mediumwechsel erfolgte nach 48 Stunden.

a) 4 Stunden nach Aussaat

b) 24 Stunden nach Aussaat

c) 48 Stunden nach Aussaat

d) 72 Stunden nach Aussaat

Zusammenfassend ist für das Wachstum der HaCaT- Keratinozyten in Zellkultur festzustellen, dass die Medien mit und ohne Phenolrot gleichwertig sind. Der optimale Zusatz von fötalem Kälberserum beträgt 10%. Der Wechsel des Mediums sollte frühestens nach 24 Stunden,

spätestens nach 48 bis 72 Stunden erfolgen. Längere Inkubationszeiten ohne Mediumwechsel sind generell möglich, jedoch nur bei geringer Zellzahl bzw. niedriger Konfluenz sinnvoll.

### 5.1.3 Zellzahl und Proteingehalt

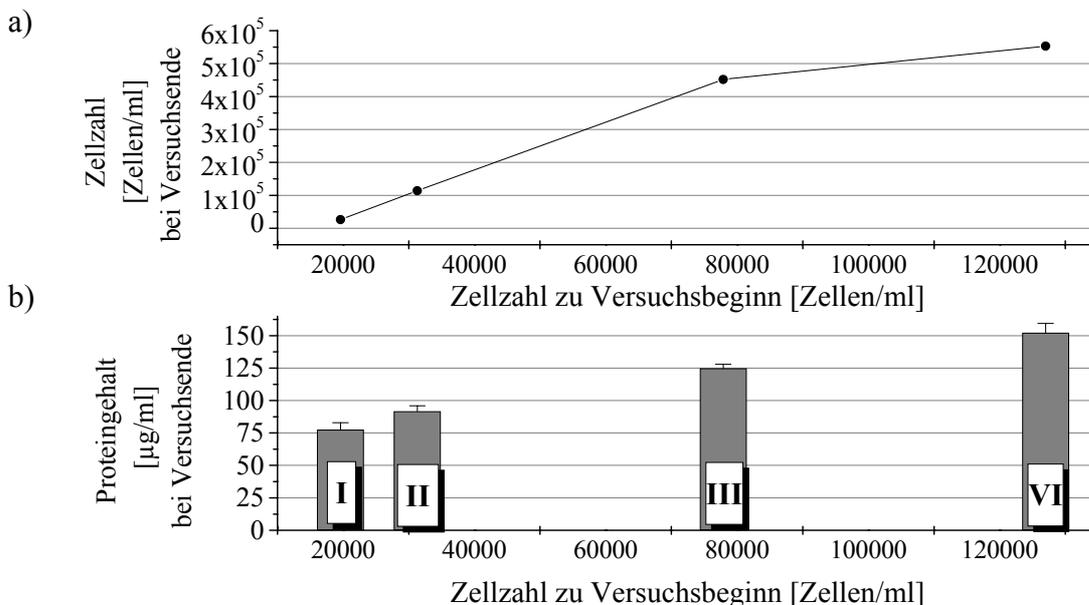
In den meisten Veröffentlichungen bezieht man sich heute nicht mehr auf die Zellzahl, sondern auf den Gesamtproteingehalt als Maß des Wachstums einer Zellkultur.

Bei der Proteingehalts-Bestimmung geht es weder darum, die genaue Zusammensetzung der Proteine noch deren Lokalisation festzustellen, vielmehr soll der Gesamtproteingehalt des Zellmaterials ermittelt werden. Da es sich in den Zellenverbänden um komplex zusammengesetzte Proteingemische handelt, ist die Standardisierung auf ein analytisch gut charakterisiertes Protein erforderlich, dazu diente in der vorliegenden Arbeit Rinderalbumin. Eine Kalibriergerade davon wurde bei jedem Versuch mitgeführt.

Wie sich der Zusammenhang zwischen Zellzahl und Proteingehalt darstellt, geben Tab. 5.1.1 und die dazugehörigen Abb. 5.1.7 a und b) wieder.

**Tab. 5.1.1:** Entwicklung von Zellzahl und Proteingehalt während des Wachstums von HaCaT-Keratinocyten P39; Medienwechsel nach 48h; Kultivierungszeit 4 Tage (96h)

	<u>Zellzahl bei Aussaat</u> [Zellen/ml]	<u>Zellzahl bei Versuchsende</u> [Zellen/ml]	<u>Proteingehalt je Well</u> [µg/ml]	<u>Konfluenz</u> [%]
IV	$1,27 \times 10^5$	$5,53 \times 10^5$	152,274	100
III	$7,79 \times 10^4$	$4,52 \times 10^5$	124,792	100
II	$3,13 \times 10^4$	$1,14 \times 10^5$	91,801	70
I	$1,96 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	77,585	40



**Abb. 5.1.7:** Entwicklung von Zellzahl und Proteingehalt während des Wachstums von HaCaT-Keratinocyten; Kultivierungszeit 4 Tage (96h)

Es wurde mit Zellen der Passage 39 gearbeitet. Die Kultivierung erfolgte in Medium A, einmaliger Medienwechsel nach 48h. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten

- Abhängigkeit des Zellwachstums von der Aussaatdichte
- Darstellung des zu a) gehörenden Proteingehaltes

Der Versuch wurde in 24-Well- Platten mit einer Fläche von  $200 \text{ mm}^2$  durchgeführt und dauerte 4 Tage. Bei Versuchsende waren die Zellen mit der höchsten Aussaatdichte schon einige Zeit konfluent (Well IV), während sich in den Wells III die Konfluenz gerade einstellte. Es ist erkennbar, dass bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in einem 24er Well die HaCaT-Keratinozyten eine Zelldichte von ca.  $5 \times 10^5$  Zellen / ml aufweisen, was einem Proteingehalt von ca.  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$  entsprach. Aus Abb. 5.1.7 geht auch hervor, dass die Zellzahl der schon längere Zeit konfluenten Zellen (IV) aufgrund der Kontakthemmung gegenüber den unkonfluenten Zellen nur noch wenig zunahm. Im Gegensatz dazu stieg ihr Proteingehalt noch deutlich weiter an.

## 5.2 Viabilitätsassays der verwendeten Substanzen

Für die Ermittlung der Zytotoxizität war es nicht nur wichtig, die verwendeten Substrate, Induktoren und Inhibitoren zu untersuchen, sondern vielmehr auch die entstehenden Produkte, da nicht selten erst durch den Metabolismus einer Substanz aktive Metabolite entstehen, die die Schädigung der Zelle bedingen.

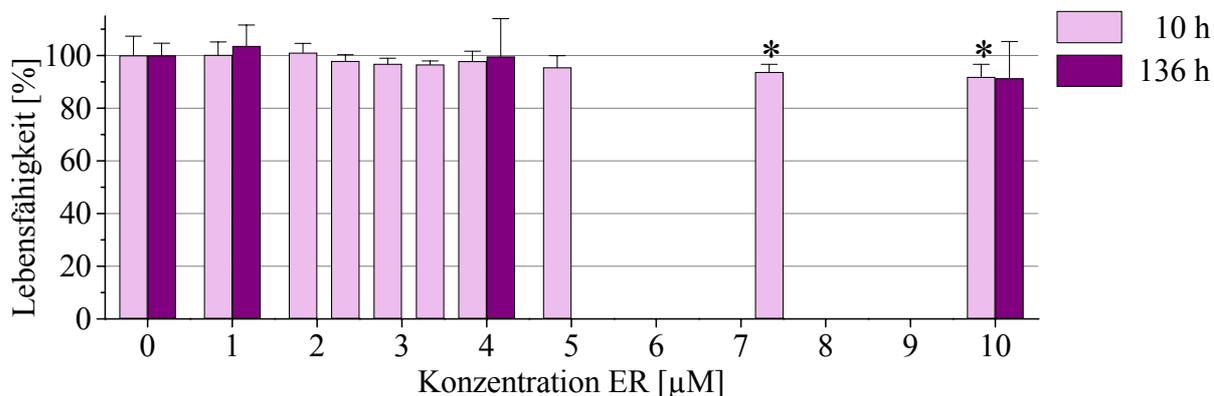
Die Ergebnisse der Toxizitätstests im Zusammenhang mit den Bestrahlungsversuchen werden in den jeweiligen Kapiteln erläutert (ab Kapitel 5.3.1.4).

### 5.2.1 Neutralrot- Test

#### 5.2.1.1 Substrate

Die Durchführung einiger Tests orientierte sich stark an den Modellreaktionen, so dass die einzelnen Versuchsbedingungen z.T. von denen im Kap. 4.2.1 abwichen, deshalb erfolgt im Text bei Abwandlung des Assays eine kurze Schilderung der jeweiligen Methodik.

*7-Ethoxyresorufin (ER)*: Es wurde mit HaCaT- Zellen der Passage 46 in 24- Well- Gewebekulturplatten gearbeitet. Bei sich einstellender Konfluenz erfolgte die Zugabe von ER 1 bis 10  $\mu\text{M}$ . Daran schloss sich die Inkubation über 10h bzw. 136h an. Nach dieser Zeit wurde das gebildete Resorufin vermessen, die Lösungen entfernt und die Zellen mit NR inkubiert, wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben.



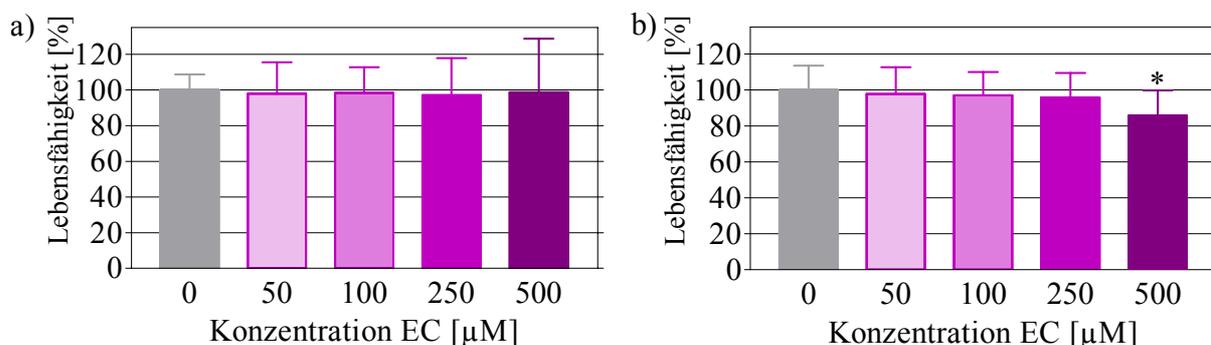
**Abb. 5.2.1:** Zytotoxizität von **7-Ethoxyresorufin** an konfluenten HaCaT- Keratinozyten P46 mittels NR- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $1,23 \times 10^5$  Zellen/ml in farblosem Medium. Der Wert  $0 \mu\text{M}$  ER stellt den Medium-Kontrollwert dar. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 10$  Experimenten,  $*p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Als Kontrolle dienten Zellen, die bei Versuchsbeginn ausgesät wurden und die den ganzen Inkubationszeitraum in Medium wuchsen. Für den Versuch über 136h wurde entgegen der sonst üblichen Durchführung das Medium nach 72h nicht erneuert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2.1 dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, hat ER auf konfluente HaCaT- Zellen erst in Konzentrationen ab  $7,5 \mu\text{M}$  membrantoxische Einflüsse, jedoch verstärkten sich diese durch längere Inkubationszeiten von bis zu 6 Tagen (136h) gegenüber der 10-stündigen Inkubation nicht.

*7-Ethoxycoumarin (EC)*: Die Toxizität dieses Substrates wurde über 48h nach den Angaben unter 4.2.1 durchgeführt. Es konnten für 50% konfluente HaCaT- Zellen keine membrantoxi-

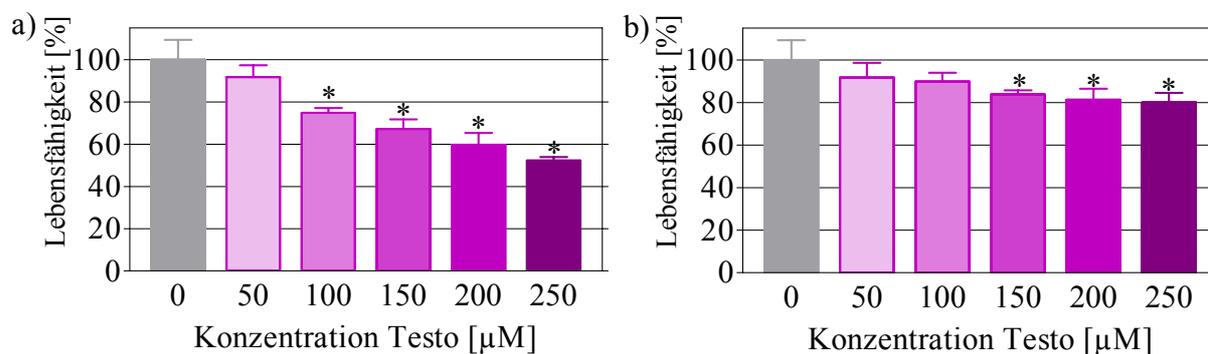
schen Effekte durch EC ermittelt werden. Dagegen wurde bei 100% konfluentem Zellrasen eine signifikante Schädigung der Zellen nach 500 $\mu$ M EC- Behandlung deutlich (siehe Abb. 5.2.2). Dies erscheint zunächst ungewöhnlich, da unkonfluente Zellen eine stärkere Teilungsaktivität aufweisen und so toxischen Einflüssen gegenüber empfindlicher reagieren. Eine Erklärung ist die erhebliche Standardabweichung in Abb. 5.2.2 a) für 500 $\mu$ M EC. Mikroskopisch waren in beiden Fällen keine Veränderungen der Zellen nach 48h Inkubation mit EC zu beobachten.



**Abb. 5.2.2:** Zytotoxizität von **7-Ethoxycoumarin** an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test

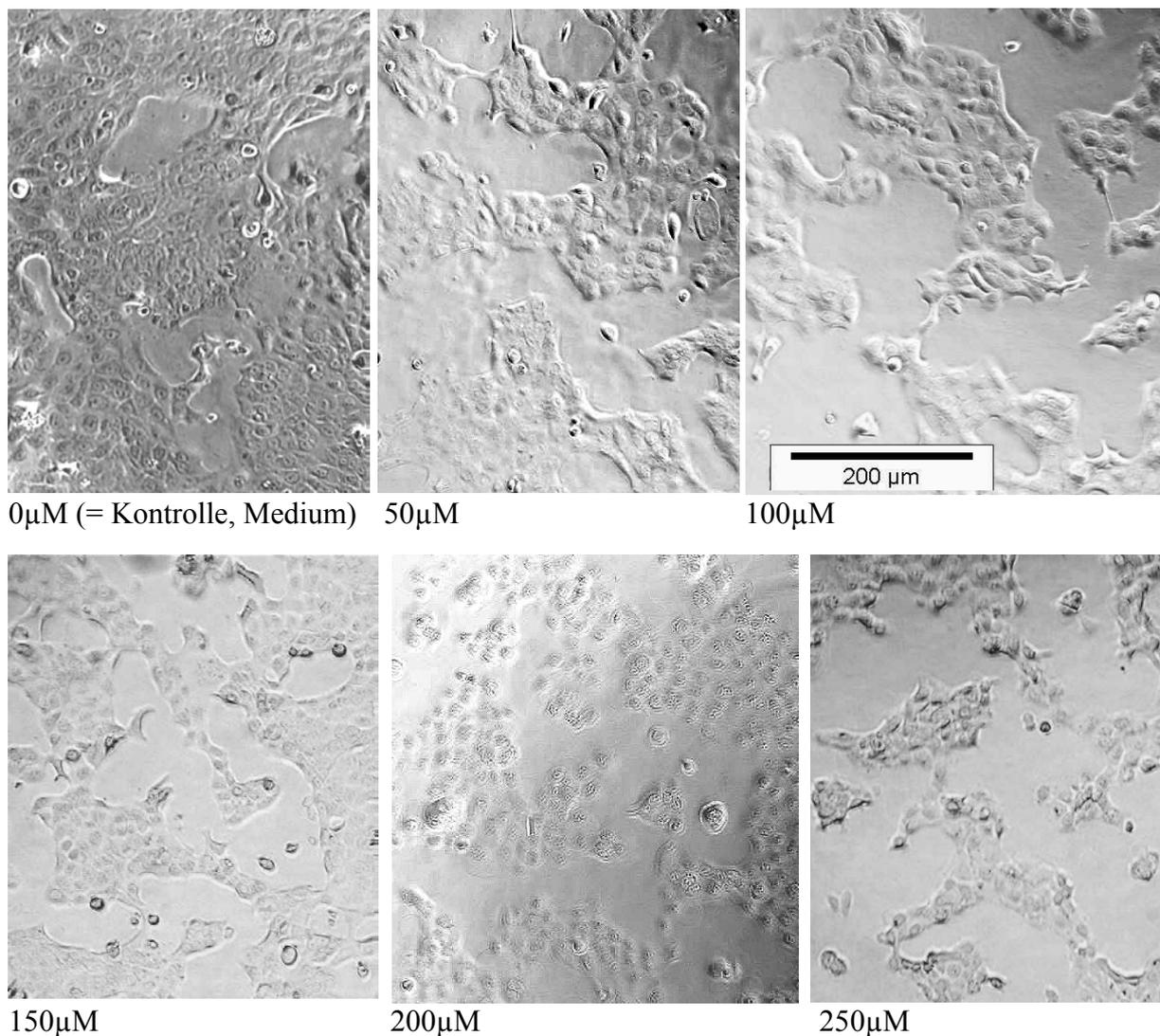
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Der Wert 0 $\mu$ M EC stellt den Medium- Kontrollwert dar. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 36 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

**Testosteron (Testo):** Es wurde mit HaCaT- Zellen der Passage 44 mit 50- bzw. 100% konfluentem Zellrasen nach den Angaben unter Kap. 4.2.1 für 48 h inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2.3 dargestellt. Die signifikante Toxizität in Diagramm 5.2.3 a) ab 100 $\mu$ M Testosteron wird im Lichtmikroskop durch verlangsamtes Wachstum gegenüber den mit Medium behandelten Zellen erkennbar. Besonders deutlich tritt sie optisch bei 250 $\mu$ M durch viele vom Zellrasen abgelöste, tote Zellen hervor. Im dazugehörigen Versuch b) waren keine negativen Effekte ersichtlich. Für den Versuch aus Abb. 5.2.3 a) wurden 12 Stunden nach Zugabe des Testosterons Fotos aufgenommen, diese sind in Abb. 5.2.4 dargestellt.



**Abb. 5.2.3:** Zytotoxizität von **Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 8 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

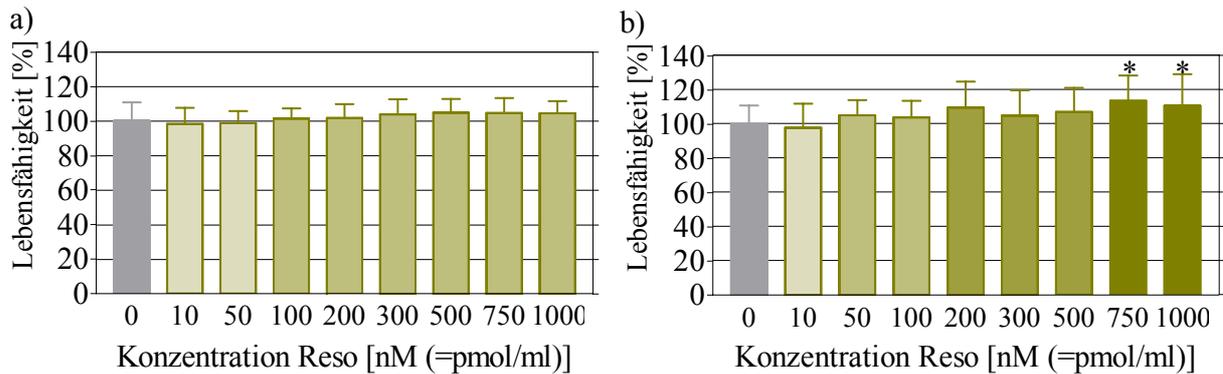


**Abb. 5.2.4:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Abb.5.2.3 a), aufgenommen 12h nach Zugabe von Testosteron, der angegebene Maßstab bei 100µM gilt für alle Fotos

Die Bilder unterstreichen das zuvor gesagte. Erkennbar ist besonders die Wachstumsverzögerung gegenüber den mit Medium behandelten Zellen. Das Foto mit 200µM Testosteron zeigt außerdem deutliches Abrunden der Zellen. Auf dem letzten Bild sehen die mit 250µM Testosteron behandelten Zellen nicht schlechter aus, als die mit 150µM behandelten, jedoch hat ein großer Teil dieser Zellen bereits die Haftung zum Gefäßboden verloren, was durch schwenken der MTP erkennbar wurde, zudem war ihr Zellplasma erheblich geschrumpft. Die geschilderten Effekte blieben auch nach 48h bestehen, allerdings war zu dem Zeitpunkt aufgrund der allmählich eintretenden Konfluenz die bildliche Aussagekraft nicht so stark, wie nach 12h.

#### 5.2.1.2 Reaktionsprodukte

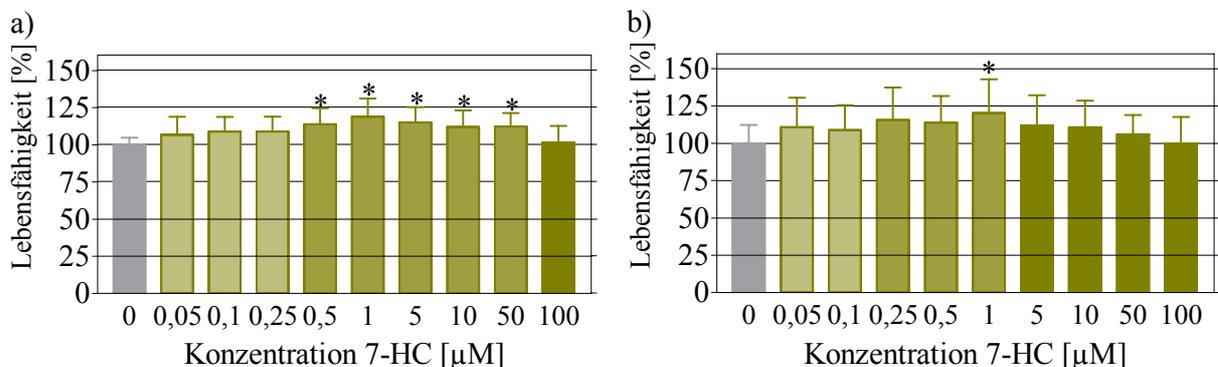
*Resorufin:* Als erstes wurde das Deethylierungsprodukt des 7-ER in einem breiten Konzentrationsbereich auf seine Membrantoxizität an HaCaT- Zellen untersucht. Die Durchführung ist im Kap. 4.2.1 erläutert. Abb. 5.2.5 zeigt die Ergebnisse nach 48-stündiger Inkubation. Bei der Bildung von bis zu 1000nM Resorufin ist nicht mit Zellschädigungen zu rechnen.



**Abb. 5.2.5:** Zytotoxizität von **Resorufin** an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 24$  Experimenten,  $*p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0nM Reso stellt den Medium- Kontrollwert dar.

**7-Hydroxycoumarin (HC):** Für das Produkt der ECOD wurde, in gleicher Weise wie zuvor, ein großer Konzentrationsbereich auf mögliche Schädigung der HaCaT's untersucht. Es konnte in Vorversuchen ermittelt werden, dass bei Einsatz von  $250\mu\text{M}$  EC nicht mehr als  $100\mu\text{M}$  Produkt zu erwarten war. Die in Abb. 5.2.6 a) im Bereich zwischen  $0,5\mu\text{M}$  und  $50\mu\text{M}$  HC erkennbare, signifikante Erhöhung der Lebensfähigkeit über 100% lässt sogar stimulierende Effekte auf das Wachstum der Zellkultur vermuten. Diese Tendenz zeigte sich auch bei konfluenten Zellen, jedoch statistisch weniger auffällig. Die Abbildung 5.2.6 macht deutlich, dass HC bis  $100\mu\text{M}$  weder auf halb- noch auf konfluente Zellen membranschädigende Auswirkungen besitzt.

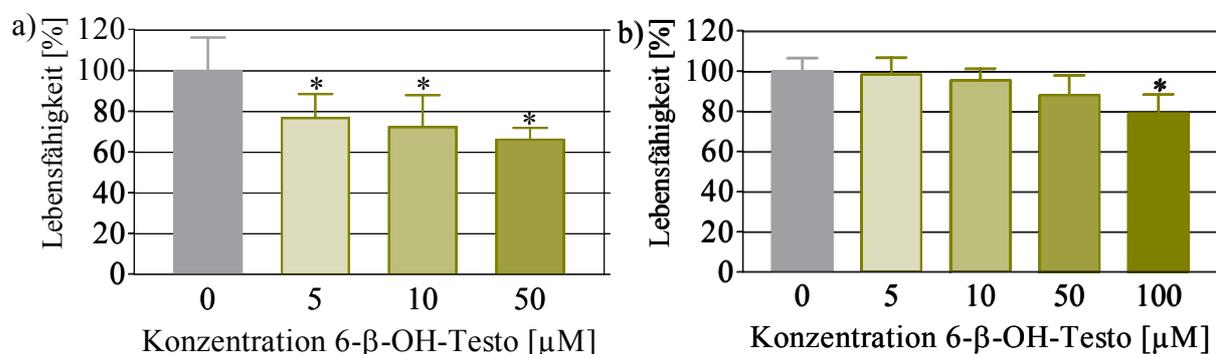


**Abb. 5.2.6:** Zytotoxizität von **7-Hydroxycoumarin** an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 28$  Experimenten,  $*p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert  $0\mu\text{M}$  7-HC stellt den Medium- Kontrollwert dar.

**6- $\beta$ -OH-Testosteron:** Die Inkubation erfolgte mit HaCaT- Zellen der Passage 44 bei 50- bzw. 100% konfluentem Zellrasen nach den Angaben unter Kap. 4.2.1 über 48 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2.7 dargestellt. Es ergab sich ein ähnliches Bild, wie für Testosteron. Auf noch nicht konfluente Zellen, die sich stärker im Wachstum befanden und eine erhöhte Teilungsaktivität aufwiesen, wirkte das Reaktionsprodukt 6- $\beta$ -OH-Testosteron deutlich toxischer, als auf einen konfluenten HaCaT- Monolayer. In der Konzentration von  $100\mu\text{M}$  war die Sub-

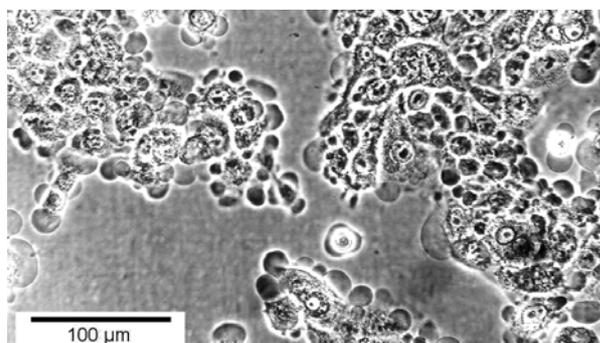
stanz so toxisch, dass keine Auswertung erfolgen konnte (50%ige Konfluenz bei Versuchsbeginn). Allerdings sei an dieser Stelle angemerkt, dass aufgrund der Ausgangskonz. der Stammlösung die Testkonzentration 6- $\beta$ -OH-T (100 $\mu$ M) einen DMSO-gehalt von 1% aufwies, was einen Teil der starken Toxizität erklärt.



**Abb. 5.2.7:** Zytotoxizität von **6- $\beta$ -OH-Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

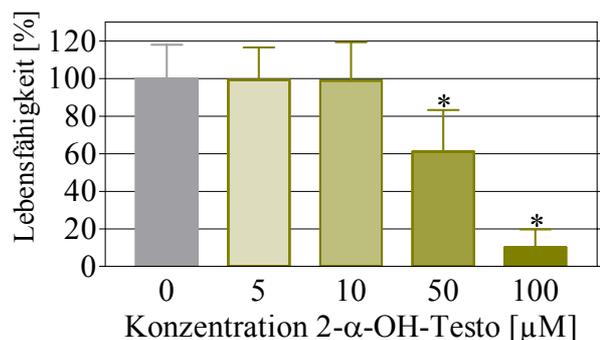
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M 6- $\beta$ -OH-Testo stellt den Medium- Kontrollwert dar.

Wie das Foto in Abb. 5.2.8 zeigt, hatten sich die Zellen abgerundet und komplett vom Gefäßboden abgelöst, so dass beim Entfernen der Medien vor NR- Zugabe selbst bei größter Vorsicht alle Zellen mit entfernt wurden. Es muss für Konzentrationen ab 100 $\mu$ M 6- $\beta$ -OH-Testo mit einer ausgeprägten Membrantoxizität gegenüber HaCaT- Zellen gerechnet werden. Falls von den abgerundeten, abgelösten Zellen einige noch am Leben waren, ist dies für die Kultur irrelevant, da in einer Monolayer- Kultur nur fest am Boden haftende Zellen zur Proliferation, zum Wachstum und damit zum Überleben befähigt sind [61].



**Abb. 5.2.8:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von HaCaT- Keratinozyten 12h nach Zugabe von 6- $\beta$ -OH-Testosteron (100 $\mu$ M) zu einem 50%ig konfluentem Monolayer

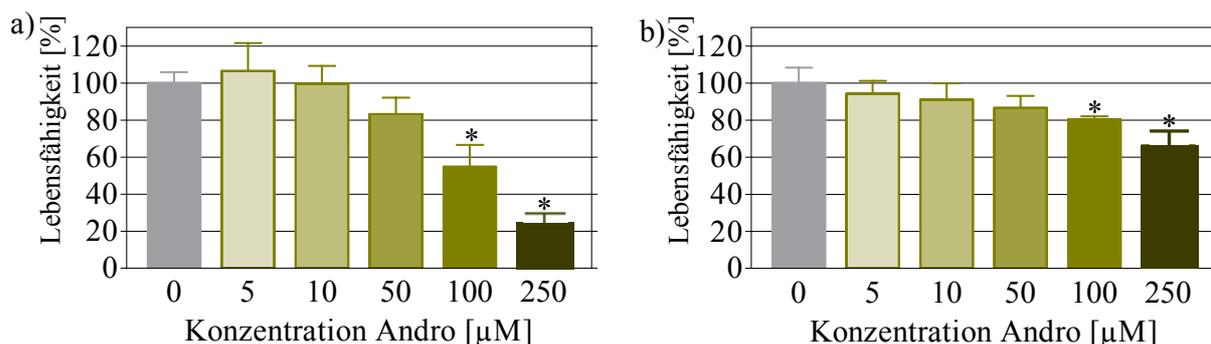
*2- $\alpha$ -OH-Testosteron*: Die Untersuchung der Zytotoxizität dieses Metaboliten des Testosterons erfolgte analog zu 6- $\beta$ -OH-Testosteron. Bei der Ermittlung der Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen wurde in diesem Fall lediglich mit 50% konfluenten Zellen gearbeitet. Nach 48stündiger Inkubation mit 2- $\alpha$ -OH-Testo ergab sich im Lichtmikroskop ein ähnliches Bild, wie nach der Behandlung mit 6- $\beta$ -OH-Testo. In Abb. 5.2.9 wird gegenüber 6- $\beta$ -OH-Testo ein etwas geringeres toxisches Potential für 2- $\alpha$ -OH-Testo (5 $\mu$ M bzw. 10 $\mu$ M) deutlich. Die Toxizität von 2- $\alpha$ -OH-Testo (100 $\mu$ M) ließ sich ermitteln, sie führte nach 48h zu einer LF von 10%. Für diese Konzentration lag der DMSO- Gehalt, wie zuvor für 6- $\beta$ -OH-Testo, bei 1%.



**Abb. 5.2.9:** Zytotoxizität von **2-α-OH-Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M 2- $\alpha$ -OH-Testo stellt den Medium- Kontrollwert dar.

*4-Androsten-3,17-dion(Andro)*: Als drittes bei der Testosteron- Metabolisierung entstehendes Produkt wurde 4-Androsten-3,17-dion erwartet und auf seine Membrantoxizität untersucht. Signifikante Werte gegenüber der Medium- Kontrolle ergaben sich nach 48h ab einer Konzentration von 100 $\mu$ M. Wie schon zuvor fiel auch hier die toxische Wirkung auf konfluente Zellen weniger ausgeprägt aus.



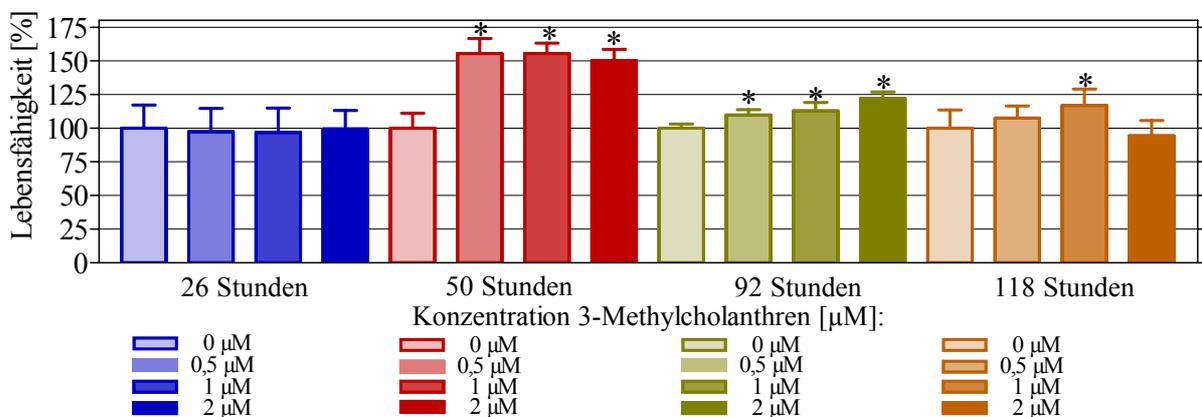
**Abb. 5.2.10:** Zytotoxizität von **4-Androsten-3,17-Dion** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M Ando stellt den Medium- Kontrollwert dar.

### 5.2.1.3 Induktoren

*3-Methylcholanthren (3-MC)*: Da für 3-MC aufgrund der Induktion eine scheinbare Lebensfähigkeit von über 100% erwartet wurde, erfolgten die Toxizitäts- Untersuchungen nicht wie bisher nur mit zweitägiger Inkubation, es wurden vielmehr auch die Einflüsse nach 26h, 92h und nach 118h getestet, um ein breiteres Bild zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2.11 dargestellt. Für diesen Versuch wurden die Zellen in 24- Well- MTP ausgesät, bei 60%iger Konfluenz 200 $\mu$ l der 3-MC- Lösungen bzw. farbloses Medium zugesetzt und anschließend 26, 50, 92 oder 118 Stunden ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach dem Entfernen der Testlösungen und Spülen mit PBS wurde mit 500 $\mu$ l NR wie unter Kap. 4.2.1 beschrieben fortgeföhren. Für jede Zeit kamen zwei MTP zur Auswertung. In Abb. 5.2.11 ist deutlich zu erkennen, dass die Zytotoxizität vom induktiven Effekt des 3-MC überlagert wurde, am stärksten ausgeprägt war dieser nach 50-stündiger Inkubation. Aber auch nach 92h überstieg die LF der indu-

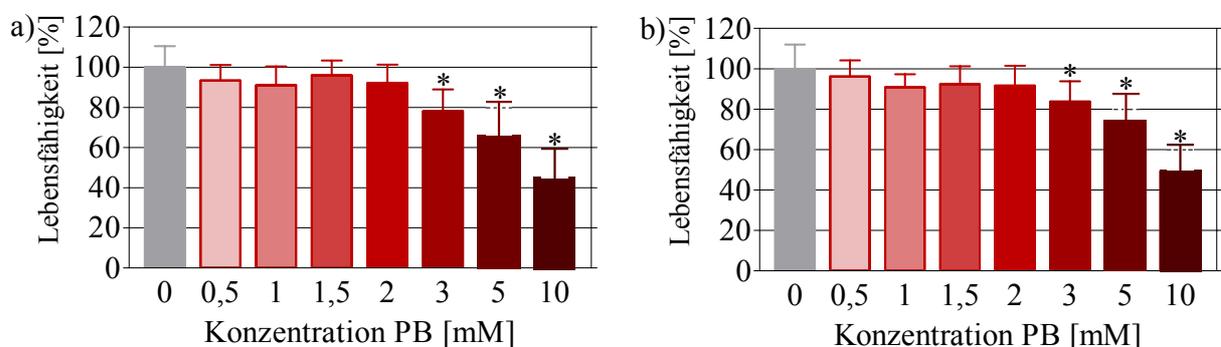
zierten Zellen signifikant die der unbehandelten Kontrolle und lag damit weit über 100%. Wirklich toxische Effekte waren erst nach 118 Stunden Inkubation mit 2  $\mu$ M 3-MC ersichtlich, die gleichzeitig durch Schrumpfung und Abrundung der Zellen lichtmikroskopisch erkennbar wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Toxizität aufgrund des starken Wachstums der Zellen aus dem Verbrauch an Medium und der Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte resultierte. Untersuchungen mit Versuchsbeginn bei 20%iger oder 100%iger Konfluenz konnten die Überlagerung der Viabilitätsbestimmung von der Induktion durch 3-MC nicht beseitigen (Daten nicht dargestellt). Damit lässt sich schlussfolgern, dass, falls 3-MC auf HaCaT- Keratinozyten in den getesteten Konzentrationen toxisch wirkt, dies durch den Zuwachs an Zellen kompensiert wird. In den Versuchen zur Biotransformation an HaCaT- Zellen überschritten die Induktionszeiten 72h nur in Ausnahmefällen, somit konnte 3-MC bis 2  $\mu$ M ohne Bedenken verwendet werden.



**Abb. 5.2.11:** Zytotoxizität von **3-Methylcholanthren** an HaCaT- Keratinozyten P48, ermittelt durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 60%. Es erfolgte kein Mediumwechsel innerhalb der Inkubationszeit mit 3-MC. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 12 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0  $\mu$ M 3-MC stellt den jeweiligen Medium- Kontrollwert dar.

*Phenobarbital (PB)*: Als zweiter Induktor wurde PB gemäß den Bedingungen im Kap. 4.2.1 auf seine Membrantoxizität an HaCaT- Zellen untersucht.



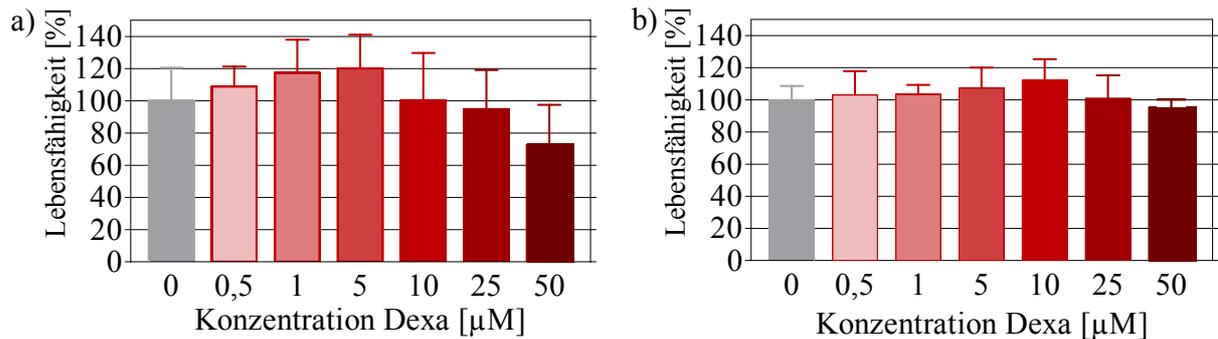
**Abb. 5.2.12:** Zytotoxizität von **Phenobarbital** an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 18 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0  $\mu$ M PB stellt den Medium- Kontrollwert dar.

In Abb. 5.2.12 ist eine signifikante Toxizität ab 3mM PB zu beobachten. Es unterschieden

sich die LF-Werte für 50%- und 100%- konfluente Zellen kaum. Ein solches Verhalten wurde bisher noch nicht festgestellt, es gab entweder keine schädigenden Einflüsse, oder sie wurden durch vollständige Konfluenz bei Versuchsbeginn erniedrigt. Im Gegensatz zur Testung von 3-MC konnte für PB kein, die Toxizität mindernder, induktiver Effekt beobachtet werden. Die Ergebnisse des NR-Tests erlauben für PB den Einsatz von bis zu 2mM über 48h, ohne die Membranen der HaCaT- Zellen zu schädigen.

*Dexamethason (Dexa)*: Für die Testosteron- Metabolisierung kamen neben den schon untersuchten Induktoren 3-MC und PB auch Dexamethason und Rifampicin zum Einsatz.

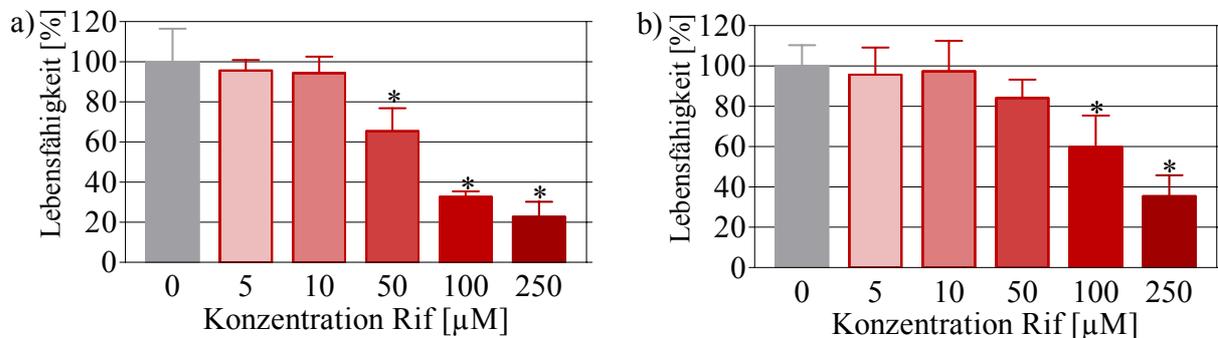


**Abb. 5.2.13:** Zytotoxizität von **Dexamethason** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Wert 0µM Dexa stellt den Medium- Kontrollwert dar.

In der Untersuchung der Toxizität zeigte Dexamethason ähnliche Effekte, wie 3-MC, allerdings schwächer ausgeprägt. So ließ sich mittels ANOVA gegenüber der Kontrolle keine signifikante Erhöhung der Lebensfähigkeit durch Induktion feststellen, wenngleich sie tendenziell erkennbar war. Die toxischen Einflüsse waren gering (Versuchsbeginn bei 50%iger Konfluenz - Abb. 5.2.13 a). Beginn der Viabilitäts- Test bei 100%iger Konfluenz des Zellrasens, wichen alle untersuchten Konzentrationen noch weniger von 100% Lebensfähigkeit ab (siehe Abb. 5.2.13 b).

*Rifampicin (Rif)*: Ganz anders als bei Dexa fielen die Ergebnisse des NR- Tests für Rifampicin aus.



**Abb. 5.2.14:** Zytotoxizität von **Rifampicin** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

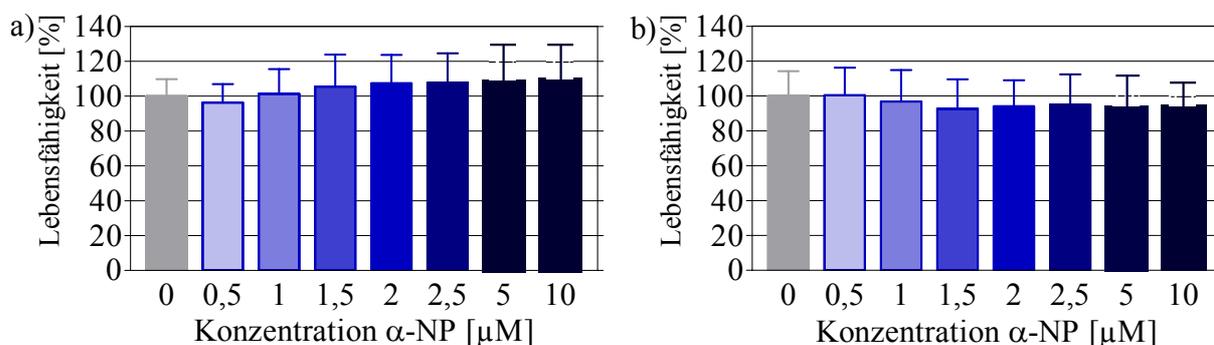
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0µM Rif stellt den Medium- Kontrollwert dar.

Es wurde, wie schon zuvor für PB, kein, die Toxizität überlagernder, induktiver Effekt beobachtet. So fanden sich für 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 250 $\mu$ M Rifampicin starke und zumindest in den beiden letzten Fällen mikroskopisch sichtbare Schädigungen der HaCaT- Zellen ähnlich Abb. 5.2.8. Insgesamt ergab sich für Rifampicin ein vergleichbares NR- Toxizitätsprofil, wie zuvor für PB. Allerdings konnte hier ein konfluenten Zellrasen zu Versuchsbeginn die Schädigung der Zellen etwas mindern. Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. 5.2.14 dargestellt.

*Clofibrat*: Dieser, zur Charakterisierung des CYP 4A anhand der 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen- Reduktion eingesetzte Induktor, wurde nicht auf seine Membrantoxizität per NR- Test untersucht. Für dessen akute Toxizität im MTT- Assay lagen bereits Daten vor [51].

#### 5.2.1.4 Inhibitoren

$\alpha$ - Naphthoflavon (*a-NP*): Als erster Inhibitor wurde  $\alpha$ -NP gemäß den Angaben im Kapitel 4.2.1 getestet. Die dabei ermittelten Werte sind in Abb.5.2.15 graphisch dargestellt. Es ergaben sich in den Untersuchungen keine Anhaltspunkte für Membranschädigungen der HaCaT- Zellen, ganz gleich, ob der Versuch mit 50% oder 100% konfluentem Zellrasen begann.



**Abb. 5.2.15:** Zytotoxizität von  $\alpha$ - Naphthoflavon an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test

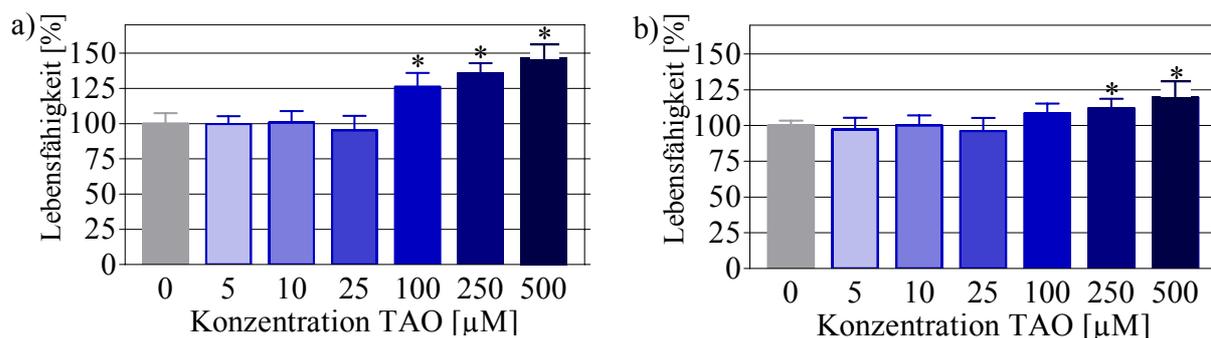
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 38 Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Wert 0 $\mu$ M  $\alpha$ -NP stellt den Medium- Kontrollwert dar.

*Proadifen*: Der Inhibitor Proadifen wurde nur anhand des MTT- Testes auf toxische Einflüsse gegenüber HaCaT- Zellen untersucht (siehe Kap. 5.2.2.4).

*Triacetyloleandomycin (TAO)*: Dieser zur Charakterisierung des CYP 3A4 verwendete Inhibitor lieferte im NR- Test unerwartete Ergebnisse. Bis zu einer Konzentration von 25 $\mu$ M TAO lag die Lebensfähigkeit nach 48-stündiger Inkubation bei knapp 100%, was nichts Außergewöhnliches darstellt. Von 100 $\mu$ M bis 500 $\mu$ M TAO nahm die LF der HaCaT- Zellen zu (Abb. 5.2.16 a). Dieses Verhalten zeigte sich analog bei den Induktoren 3-MC und in geringerem Ausmaß bei Dexamethason. Für TAO sind anhand dieser Daten nicht nur hemmende, sondern auch induktive Effekte auf HaCaT- Zellen denkbar. Da die gefundenen Ergebnisse überraschten, wurde der Versuch zu einem späteren Zeitpunkt mit der gleichen Passage neu kultivierter HaCaT- Zellen wiederholt und führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Auf 100%ig konfluenten Zellen zeigte sich diese Tendenz im Verhalten von TAO nicht (Abb. 5.2.16 b).

Die im NR- Assay ermittelten Ergebnisse legen für den Einsatz von TAO den Schluss nahe, ein breites Konzentrationsspektrum in den Biotransformationsuntersuchungen zu testen, da

dessen Verwendung eventuell nicht nur zu hemmenden Effekten führt, sondern auch eine Induktion möglich scheint.



**Abb. 5.2.16:** Zytotoxizität von **Triacetyloleandomycin (TAO)** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a) 50%** und **b) 100%**. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 16$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert  $0\mu\text{M}$  TAO stellt den Medium- Kontrollwert dar.

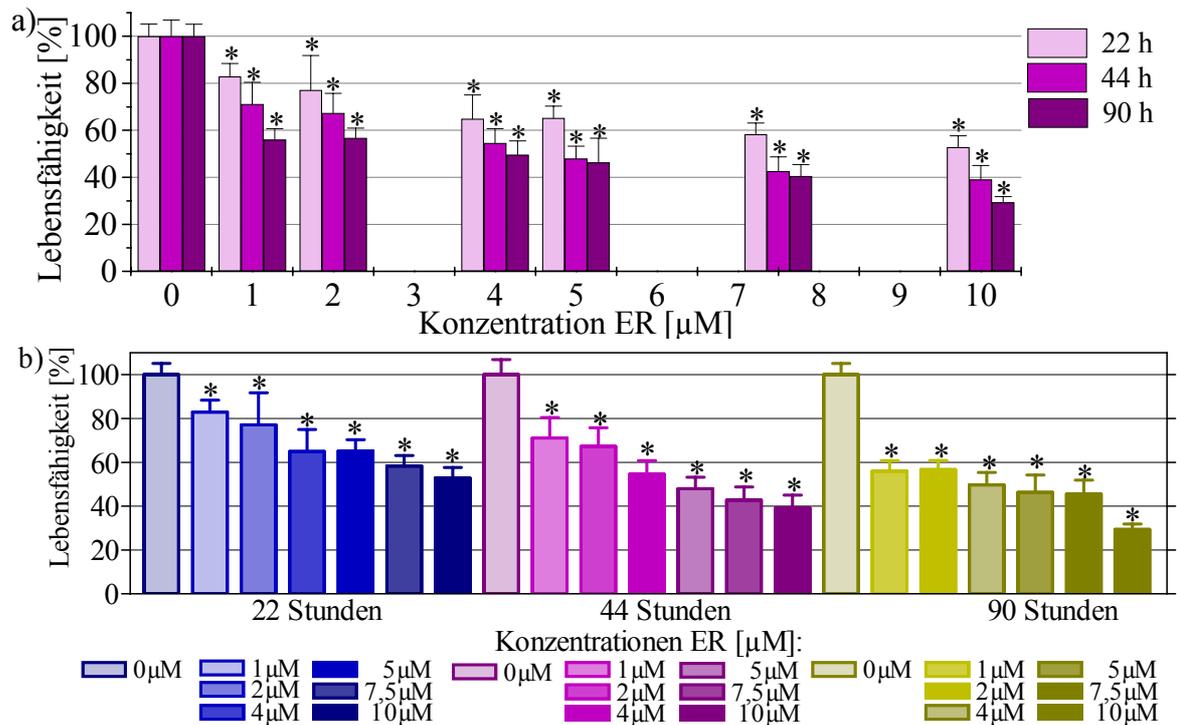
*Metyrapon*: Metyrapon wurde als Induktor des CYP4A bei der 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen- Reduktion eingesetzt. Zur Ermittlung der Toxizität dieser Substanz gegenüber HaCaT- Zellen wurde auf die Ergebnisse des MTT- Assay von Dietrich, A. [51] zurückgegriffen, die einen Einsatz bis  $5\mu\text{M}$  Metyrapon erlauben. Ein zusätzlicher Membrantoxizitätstest per Neutralrot- Bestimmung wurde nicht durchgeführt.

## 5.2.2 MTT- Test

### 5.2.2.1 Substrate

Die Methodik einiger Tests orientierte sich stark an den Modellreaktionen, so dass mitunter die Versuchsbedingungen von denen im Kapitel 4.2.2 abwichen, es erfolgt ggf. im Text bei Abwandlung des Assays eine kurze Schilderung der Durchführung.

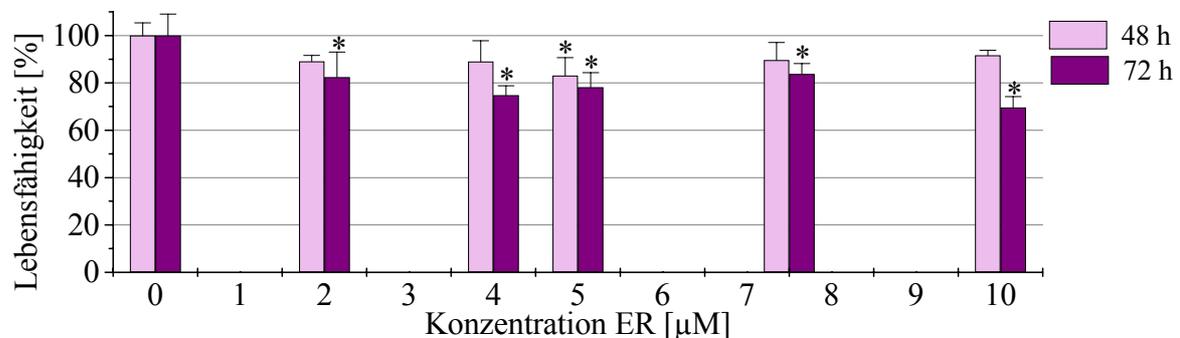
*7- Ethoxyresorufin (ER)*: In Abb. 5.2.17 sind die Ergebnisse des MTT- Tests für ER dargestellt. Die Durchführung entsprach den Angaben in Kap. 4.2.2. Der Versuch wurde bei 10%-iger Konfluenz des Zellrasens begonnen, da sich der Test über 90h erstreckte und die Kultur sich für den gesamten Zeitraum in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollte. Das MTT- Reagens fand unverdünnt Verwendung. Die Abbildung 5.2.17 a) lässt einen Vergleich mit dem NR- Test zu. Es fällt im MTT -Assay auf, dass alle ER- Konzentrationen zu jeder Zeit signifikant unter dem Medium- Kontrollwert lagen. Im NR- Test wirkte ER ( $10\mu\text{M}$ ) über 136h mit ca. 10% Toxizität vergleichsweise gering schädigend. Dagegen erwies sich diese Konzentration im MTT- Test über 90h als siebenfach toxischer. Bedenkt man, dass der NR- Assay mit 100%iger im Gegensatz zu 10%iger Konfluenz des MTT- Testes begonnen wurde, verwundern diese Ergebnisse wenig. Um besser vergleichen zu können, erfolgte ein weiterer MTT- Test mit Versuchsbeginn bei 100%iger Konfluenz (Abb.5.2.18). Die Abb. 5.2.17 b) verdeutlicht die konzentrationsabhängige Toxizität des ER, die sich zusätzlich mit der Dauer der Inkubationszeiten verstärkte. Ethoxyresorufin sollte immer in geringer Konzentration eingesetzt werden, wenn die HaCaT- Zellen noch keine Konfluenz erreicht haben.



**Abb. 5.2.17:** Zytotoxizität von 7-Ethoxyresorufin an HaCaT- Keratinozyten P37 mittels MTT- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium. Die Abbildungen a) und b) geben die gleichen Werte unter verschiedenen Aspekten wieder. Die Konfluenz des Zellrasens entsprach zu Versuchsbeginn ca. 10%, nach 22h 20%, nach 44h 40% und nach 90h 80%.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten,  $*p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert  $0\mu\text{M}$  ER stellt den Medium-Kontrollwert dar.



**Abb. 5.2.18:** Zytotoxizität von 7-Ethoxyresorufin an konfluenten HaCaT- Keratinozyten P47 mittels MTT- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $8 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium, Versuchsbeginn bei eintretender Konfluenz. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten,  $*p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert  $0\mu\text{M}$  ER stellt den Medium-Kontrollwert dar.

Wie die Abb. 5.2.18 zeigt, ist die Toxizität von ER im MTT- Test an konfluenten HaCaT- Zellen deutlich geringer ausgeprägt. Für  $10\mu\text{M}$  ER ergab sich nach 44h mit 39% Lebensfähigkeit eine annähernd 60%ige Toxizität (40%Konfluenz), dagegen wirkte die gleiche Konzentration nach 48h auf konfluente Zellen noch nicht mal 10% toxisch, mit einer LF von 91%. Es wird aber auch deutlich, dass die zytotoxischen Wirkungen im MTT- Assay mehr zum tragen kamen, als dies mit NR der Fall war (vgl. auch Abb. 5.2.1)

Bereits vorangegangene Untersuchungen von Dietrich, A. [51] belegten den Einfluss der Kon-

fluenz des Zellrasens auf die MTT- Toxizität (siehe Tab. 5.2.1).

**Tab. 5.2.1:** Zytotoxizität von **7-Ethoxyresorufin** an HaCaT- Keratinozyten ermittelt per MTT- Test, hervorgehoben die Werte für die Lebensfähigkeit [%]

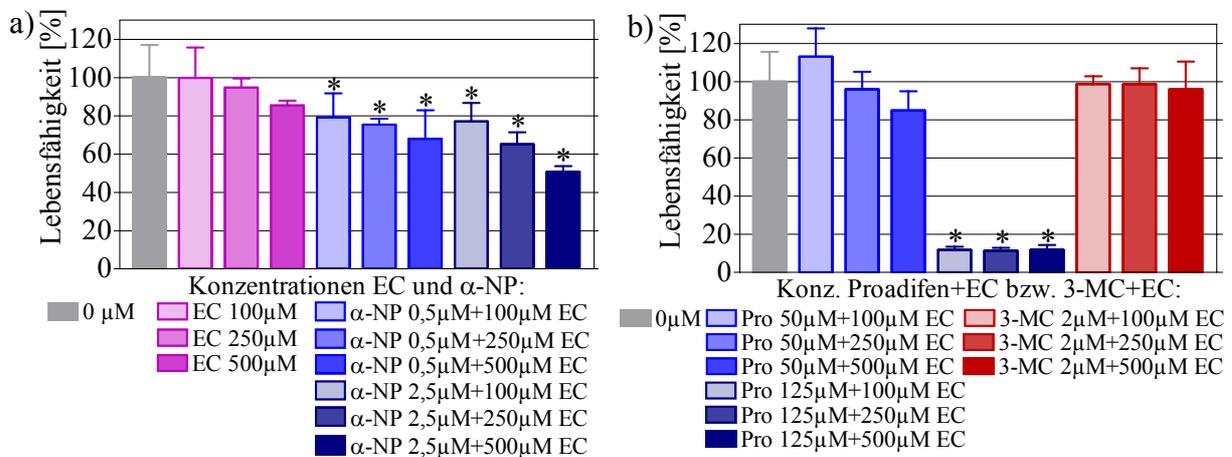
Eigene Werte für 7-ER:

Werte für 7-ER aus [51]:

Konz. ER [µM]:							Inkubationszeit [h]	Konfluenz [%]	Konz. ER [µM]:						Inkubationszeit [h]	Konfluenz [%]
	1	2	4	5	7,5	10				1,5	2	2,5	5	10		
Lebensfähigkeit[%]:	<b>71</b>	<b>67</b>	<b>55</b>	<b>48</b>	<b>43</b>	<b>39</b>	44	40	<b>64</b>	<b>46</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	<b>46</b>	48	40	
		<b>89</b>	<b>89</b>	<b>83</b>	<b>90</b>	<b>92</b>	48	100	<b>92</b>	<b>89</b>	<b>88</b>	<b>110</b>	<b>115</b>	48	70	

Aus allen gefundenen Werten lässt sich schlussfolgern, dass ER, wie bereits erwähnt, nicht zu hoch konzentriert eingesetzt werden sollte. Maximal 5µM sind akzeptabel, wenn mit Zellen gearbeitet wird, deren Konfluenz erreicht ist. Wenn dies nicht der Fall ist, sollte ER nur als 2µM Lösung Verwendung finden. Dies korreliert mit der Literatur, in der bei Untersuchungen an HaCaT ebenfalls ER (2µM) eingesetzt wurde [47;48;110]. An nativen Keratinozyten wurde mit ER (1,5µM) gearbeitet [165] und an Hepatozyten kam ER in 5µM Konzentration zum Einsatz [36].

**7-Ethoxycoumarin (EC):** Dieses Substrat wurde nicht nur allein, sondern, wie in den Modellreaktionen angewandt, in gleichzeitiger Kombination mit den Inhibitoren α-NP und Proadifen, sowie auch mit vorangehender Induktion durch 3-MC getestet (Abb. 5.2.19). Des Weiteren erfolgte die Zytotoxizitätsuntersuchung der kompletten Modellreaktion (Abb. 5.2.20).



**Abb. 5.2.19:** Zytotoxizität von **7-Ethoxycoumarin** an HaCaT- Keratinozyten P58 mittels MTT- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $7,1 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium.

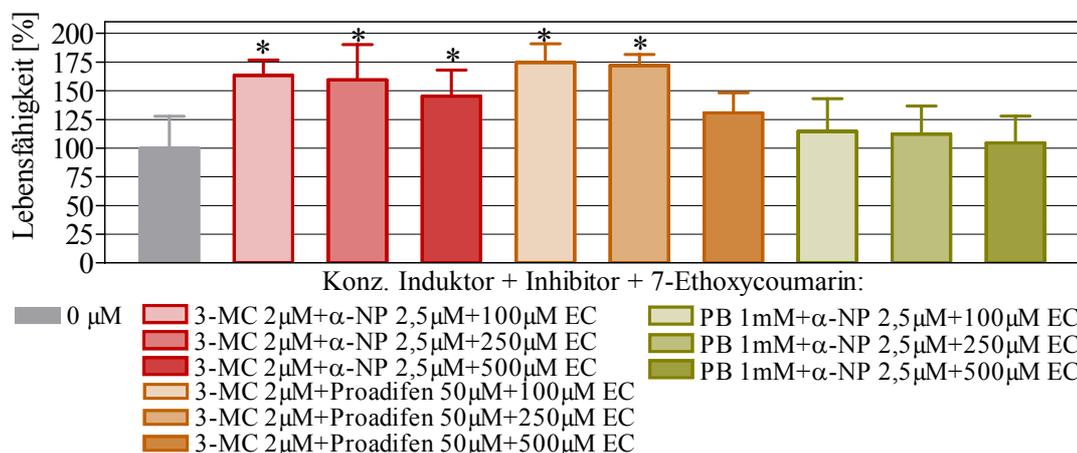
Abb. a): Versuchsbeginn bei 50%iger Konfluenz; Zugabe von EC bzw. α-NP + EC, Inkubation 48h

Abb. b): Versuchsbeginn bei 50%iger Konfluenz; Zugabe von 3-MC, Inkubation über 24h, entfernen des Induktors, dann Zusatz von EC zu diesen Wells, bzw. Zugabe von Proadifen + EC in alle anderen Wells gleichzeitig mit a); Inkubation 48h.

Daraus ergaben sich Testzeiten für 3-MC = 24h; α-NP, Proadifen und EC = 48h. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 6 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber dem Medium- Kontrollwert, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0µM stellt den Medium- Kontrollwert dar.

In Abb. 5.2.19 a) ist die konzentrationsabhängige Toxizität des ECs erkennbar, die sich bis 500µM über 48h gegenüber der unbehandelten Kontrolle als nicht signifikant erwies. Der

gleichzeitige Einsatz von  $\alpha$ -NP und EC verminderte die Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen mit steigenden Konzentrationen beider Substanzen. Der Inhibitor Proadifen (Konz.  $50\mu\text{M}$ ) zeigte in Kombination mit EC eine ähnliche Toxizität, wie EC allein. Ganz anders war sein Verhalten in  $125\mu\text{M}$ -er Konzentration. Eine verbleibende LF von ca. 11% deutete auf starke Zellschädigungen hin, die sich auch unter dem Mikroskop beobachten ließen (nicht dargestellt- vergleichbar mit Abb. 5.2.8). Bei der Untersuchung von 3-MC in Kombination mit EC überlagerten sich Zellzuwachs durch Induktion und toxische Effekte. Dadurch wurde z.B. die LF von EC ( $500\mu\text{M}$ ) von 85% (Abb. 5.2.19 a) mit dem Einsatz von 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ) auf 96% erhöht (Abb. 5.2.19 b). Abgeleitet aus den bislang ermittelten Daten zur Toxizität wurde das Design für den Versuch in Abb. 5.2.20 festgelegt, so wie es später bei der kompletten Modellreaktion eingesetzt werden sollte. Dabei kam  $\alpha$ -NP in der größten Konzentration von  $2,5\mu\text{M}$  zum Einsatz, Proadifen hingegen nur mit  $50\mu\text{M}$ . Als weiterer Induktor wurde PB getestet. Aus einer derartigen Versuchsanordnung ergaben sich keine Hinweise auf signifikante, zelltoxische Wirkungen an den HaCaT- Zellen.

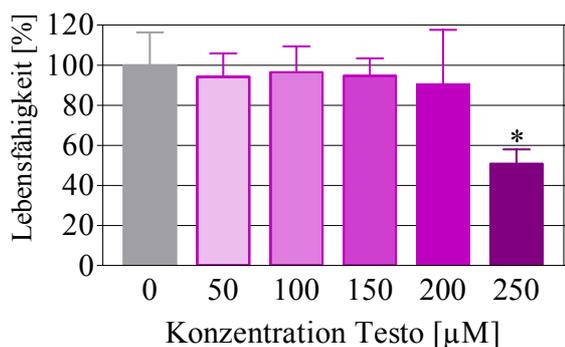


**Abb. 5.2.20:** Zytotoxizität der kompletten Modellreaktion von **7-Ethoxycoumarin** an HaCaT-Keratinocyten P58 mittels MTT- Test (incl. Induktion und Inhibition)

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $7,1 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium. Versuchsbeginn bei 50%iger Konfluenz mit der Zugabe von 3-MC bzw. PB; Inkubation über 24h; Entfernen der Induktoren; Zusatz von  $\alpha$ -NP + EC bzw. Proadifen + EC und Inkubation über 48h. Daraus ergeben sich Testzeiten für 3-MC und PB = 24h,  $\alpha$ -NP, Proadifen und EC = 48h. Der Kontrollwert wurde über den gesamten Zeitraum nur mit Medium inkubiert.

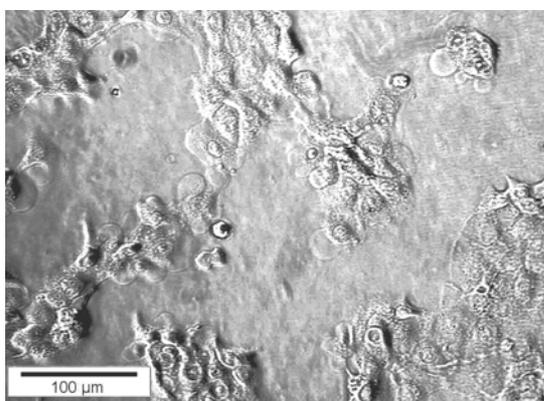
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert  $0\mu\text{M}$  stellt den Medium- Kontrollwert dar

**Testosteron:** Die Untersuchung des CYP 3A4- Substrates erfolgte laut Kapitel 4.2.2. Allerdings führte die Verdünnung des MTT- Reagenzes 1:4 zu Extinktionswerten über 2. Deshalb wurde das Reagens 1:14 verdünnt, was einer Endkonzentration von  $35,7\mu\text{g/ml}$  entsprach. Im Vergleich zum NR- Test fiel die mitochondriale Toxizität des MTT- Assays bei 50%iger Konfluenz deutlich geringer aus (vgl. Abb. 5.2.3 a mit 5.2.21). Obwohl für  $200\mu\text{M}$  aufgrund der großen Standardabweichung keine signifikante Toxizität gegenüber dem Kontrollwert nach 53h feststellbar war, zeigten sich im Mikroskop morphologische Veränderungen, wie Schrumpfung und Abrundung. Diese konnte in stärkerem Umfang für Testosteron ( $250\mu\text{M}$ ) beobachtet werden, hier traten die Veränderungen schon nach 24h auf (Fotos in Abb. 5.2.22).

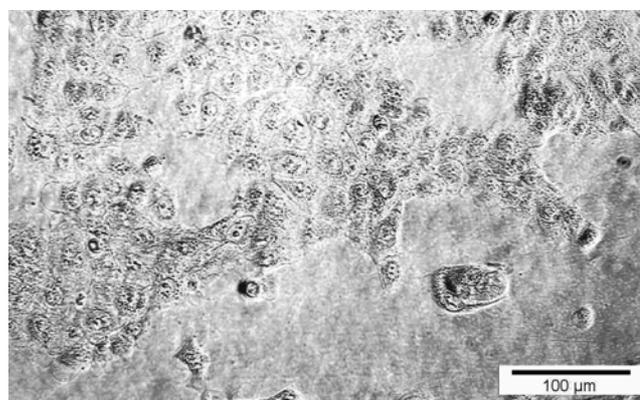


**Abb. 5.2.21:** Zytotoxizität von **Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0µM Testo stellt den Medium- Kontrollwert dar.



200µM Testosteron



250µM Testosteron

**Abb. 5.2.22:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Abb. 5.2.21, aufgenommen 24h nach Zugabe von Testosteron

Auf die Untersuchung der MTT- Toxizität des Testosterons mit konfluentem Zellrasen wurde verzichtet, da vorangegangene Versuche eine Minderung des zytotoxischen Effekts ähnlich dem NR- Test zeigten. Testosteron sollte für die Modellreaktionen in Konzentrationen bis 100µM eingesetzt werden, sind höhere Konz. erforderlich, ist mit konfluenten Zellen zu arbeiten oder die Inkubationszeit gering zu halten.

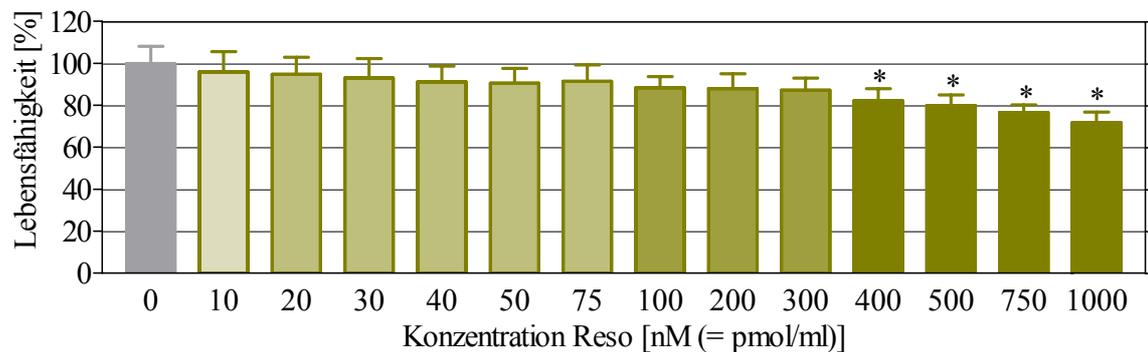
*4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen (DAB)*: Die MTT- Toxizität des CYP 4A- Substrates an HaCaT- Zellen wurde von Dietrich, A. bestimmt [51]. DAB- Konzentrationen bis 300µM verursachten über 72h an 70% konfluenten Zellen keine nachweisbaren Beeinträchtigungen der Lebensfähigkeit, erst ab 500µM DAB wurden signifikante Schädigungen offensichtlich.

#### 5.2.2.2 Reaktionsprodukte

*Resorufin*: Zur Untersuchung kam Resorufin in einem breiten Konzentrationsbereich, da nicht genau abzuschätzen war, wie viel Produkt bei der Umsetzung von 2µM 7-ER entsteht. Abb. 5.2.23 zeigt, dass eine signifikante Toxizität von Resorufin ab 400nM zu erwarten ist, jedoch konnten bis Resorufin (1000nM) lichtmikroskopisch keine Veränderungen an den Zellen beobachtet werden. Ebenso wurde im NR- Test keine Verminderung der LF ermittelt.

Die Ergebnisse des MTT- Tests für Reso erklären die gefundenen Werte für ER. So resultierte

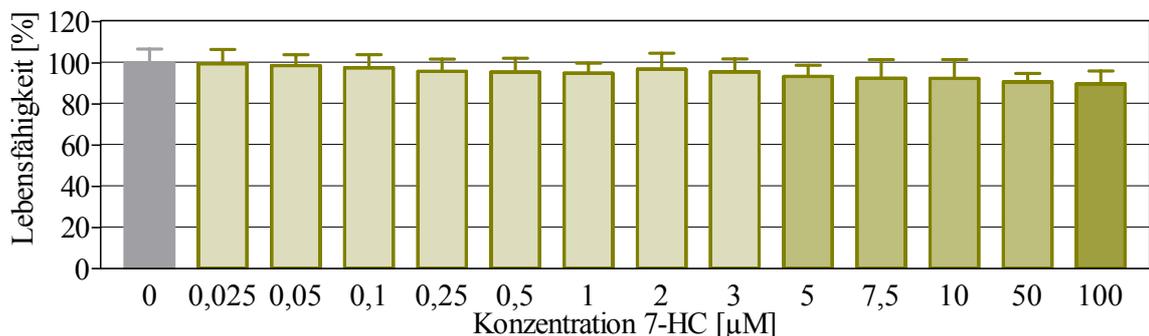
für ER (1 $\mu$ M) über 44h eine Lebensfähigkeit von ca. 71% (siehe Abb. 5.2.17), für 1 $\mu$ M Resorufin ergab sich ein Wert von 72%. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der größte Teil der Toxizität des 7-ER durch sein Deethylierungsprodukt Resorufin hervorgerufen wurde.



**Abb. 5.2.23:** Zytotoxizität von **Resorufin** an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch MTT- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M Reso stellt den Medium- Kontrollwert dar.

**7- Hydroxycoumarin (HC):** Für HC wurde ein großer Konzentrationsbereich über 48h auf seine Toxizität untersucht. Mit einem Einsatz von 250 $\mu$ M 7-EC konnte anhand von Vorversuchen die Produktmenge auf höchstens 100 $\mu$ M (=100000 pmol/ml) 7-HC eingegrenzt werden. Die Ergebnisse des MTT- Assays stellt Abb. 5.2.24 dar.



**Abb. 5.2.24:** Zytotoxizität von **7-Hydroxycoumarin** an HaCaT- Keratinozyten P59, ermittelt über 48h durch MTT- Test

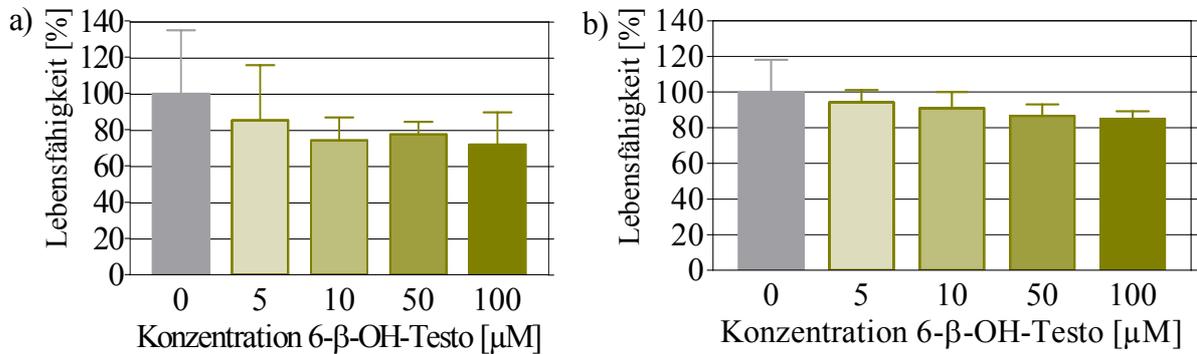
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 8$  Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Wert 0 $\mu$ M 7-HC stellt den Medium- Kontrollwert dar.

Bei der Varianzanalyse ergab sich kein Hinweis auf eine signifikante Toxizität von 7-HC gegenüber HaCaT- Zellen. Aufgrund der ermittelten hohen Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen nach HC- Behandlung bei 50%iger Konfluenz zu Versuchsbeginn und den Werten der NR- Testung, wurde auf den MTT- Assay an konfluenten Zellen verzichtet.

**6- $\beta$ -OH-Testosteron:** Die Untersuchung dieses Testosteron- Metaboliten erfolgte nach den Angaben unter Kapitel 4.2.2. Wie schon für Testosteron musste auch hier das MTT- Reagens 1:14 verdünnt eingesetzt werden. Die Abbildung 5.2.25 zeigt die Ergebnisse des Tests.

In beiden Versuchen zeigte sich keine signifikante Toxizität. Beide Abbildungen sind denen der Abb. 5.2.7 des NR- Testes vergleichbar. Der einzige Unterschied zwischen den Tests lag darin, dass sich für 6- $\beta$ -OH-Testo (100 $\mu$ M) im MTT- Assay ein Wert ermitteln ließ. Dies war

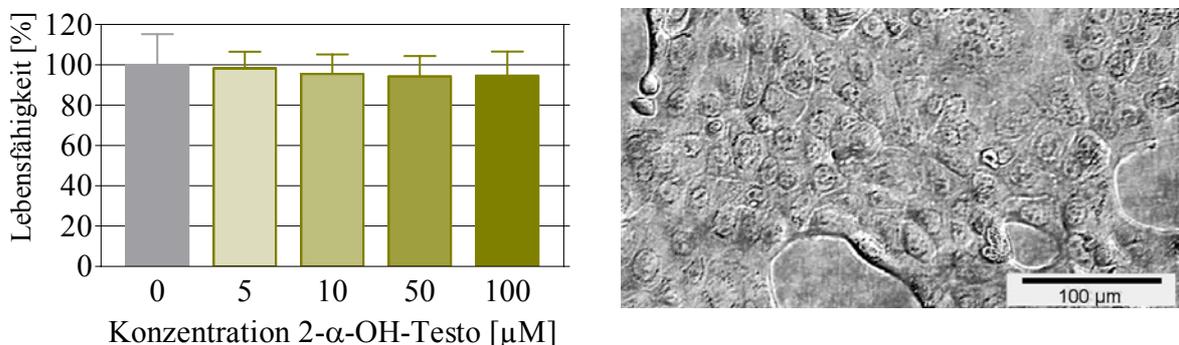
bedingt durch den Ablauf des MTT- Tests, indem die Substanz nach abgelaufener Inkubationszeit zusammen mit dem MTT- Reagens auf den Zellen verblieb. Eine Schädigung der HaCaT- Zellen wurde im Lichtmikroskop deutlich, es zeigte sich ein Bild vergleichbar dem aus Abb. 5.2.8 des NR- Tests.



**Abb. 5.2.25:** Zytotoxizität von **6-β-OH-Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei **a)** 50% und **b)** 100%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten in a) und  $n = 8$  in b). Die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Wert  $0\mu\text{M}$  6-β-OH-Testo stellt den Medium- Kontrollwert dar.

*2-α-OH-Testosteron:* Auch dieser Testosteron- Metabolit wurde mit 1:14 verdünntem MTT- Reagens umgesetzt. Wie die Abb. 5.2.26 zeigt, hatte 2-α-OH-Testo über 53h auf 50% konfluente HaCaT- Zellen keine nennenswert toxischen Einflüsse, deshalb wurde der Versuch nicht an konfluenten Zellen wiederholt. Zeigte 6-β-OH-Testo eine fast identische Toxizität im NR- und MTT- Assay, so ergab sich für 2-α-OH-Testosteron in beiden Tests ein verschiedenes Bild. Die Lebensfähigkeit lag im NR- Test für 2-α-OH-Testo ( $50\mu\text{M}$ ) bei 60% und in der Konzentration  $100\mu\text{M}$  nur noch bei 10%, dagegen fiel sie im MTT- Assay nie unter 94%. Bemerkenswert sind auch die völlig intakten Zellen 24h nach der Substratzugabe (Abb.5.2.26 rechts). Obwohl für dieses Verhalten keine Erklärung ermittelt wurde, fand keine Wiederholung des MTT- Testes statt, da dieser Metabolit nur der Kontrolle diente und in den Biotransformationsuntersuchungen nicht erwartet wurde.

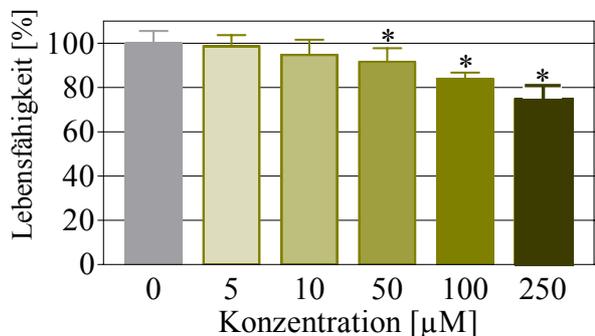


**Abb. 5.2.26:** Zytotoxizität von **2-α-OH-Testosteron** an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test

Das Foto zeigt die Zellen mit 2-α-OH-Testo ( $100\mu\text{M}$ ) 24h nach Substratzugabe.

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der un- behandelten Kontrolle. Der Wert  $0\mu\text{M}$  2-α-OH-Testo stellt den Medium- Kontrollwert dar.

*4-Androsten-3,17-dion(Andro)*: Auch in dieser Untersuchung wurde das MTT- Reagens 1:14 verdünnt angewandt. Wie zuvor für Testosteron und 2- $\alpha$ -OH-Testosteron ermittelt, erwies sich auch Androstendion im MTT- Test als weniger toxisch im Vergleich zum NR- Assay. Die hier gefundenen LF- Werte für 50%ig konfluente HaCaT- Zellen waren vergleichbar mit denen für 100% konfluente Zellen des NR- Testes (vgl. Abb. 5.2.27 mit Abb. 5.2.10 b).



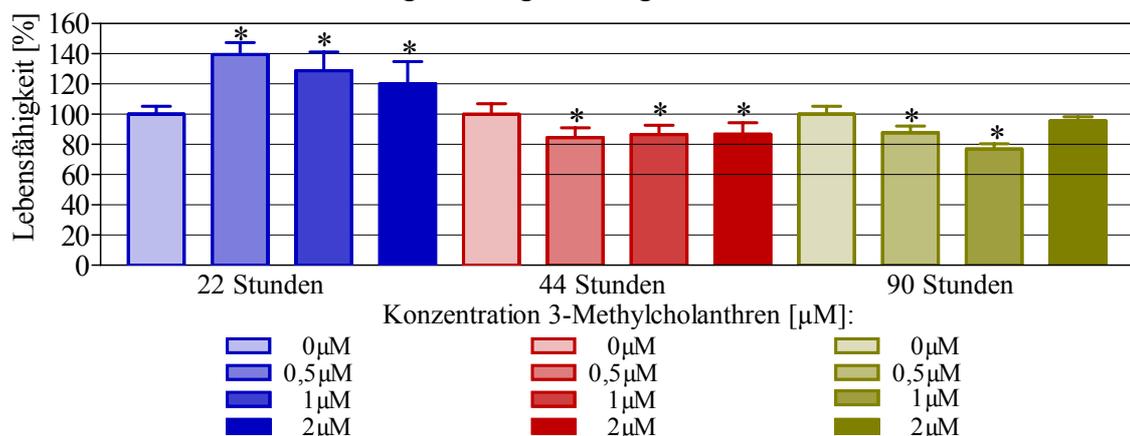
**Abb. 5.2.27:** Zytotoxizität von **4-Androsten-3,17-Dion** an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 16$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M Andro stellt den Medium- Kontrollwert dar

Mikroskopisch waren nur geringe Abrundungen bei 250 $\mu$ M Andro zu beobachten. Aufgrund der recht geringen Toxizität auf halb konfluente Zellen, entfiel ein zweiter Versuch mit konfluenten Zellen.

### 5.2.2.3 Induktoren

*3-Methylcholanthren (3-MC)*: Die 3-MC-MTT-Testung erfolgte entsprechend den Angaben in Kapitel 4.2.2. In Anlehnung an die Testzeiten des NR- Assays wurden hier die Zellen 22h, 44h und 90h mit 3-MC inkubiert, beginnend bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 10%. Über die gesamte 90-stündiger Inkubation wurde das Medium nicht erneuert. Das MTT- Reagens fand unverdünnt Verwendung. Die Ergebnisse gibt Abb. 5.2.28 wieder.

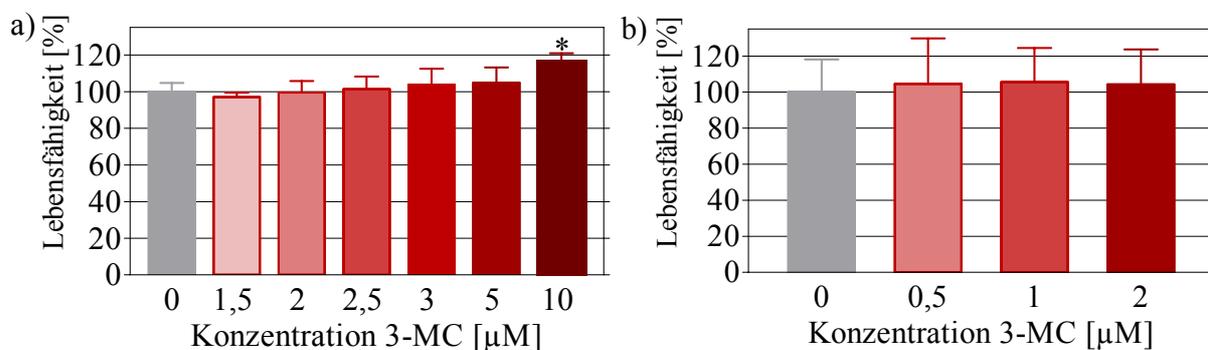


**Abb. 5.2.28:** Zytotoxizität von **3-Methylcholanthren** an HaCaT- Keratinozyten P37, ermittelt durch MTT- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium. Die Konfluenz des Zellrasens entsprach zu Versuchsbeginn ca. 10%, nach 22h 20%, nach 44h 40% und nach 90h 80%. Es erfolgte kein Mediumwechsel innerhalb der Inkubationszeit mit 3-MC.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle 3-MC=0 $\mu$ M, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Zwei darauf folgende Tests wurden mit 70%iger Konfluenz (Abb. 5.2.29 a) bzw. mit 100%iger Konfluenz (Abb. 5.2.29 b) begonnen. Die Inkubationszeit mit 3-MC betrug jeweils 72h. Versuch 5.2.29 a) beinhaltet zusätzlich die Testung von 3-MC (2,5 $\mu$ M; 3 $\mu$ M; 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M) über den Zeitraum von 72h. Aus allen drei Abbildungen wird deutlich, dass 3-MC auf HaCaT- Zellen nicht nennenswert toxisch wirkt, auch nicht in der größten untersuchten Konz. von 10 $\mu$ M über 72h. Dieses Ergebnis korreliert mit Angaben in der Literatur [8;159] (keine MTT- Toxizität von 3-MC (10 $\mu$ M) über 48h an humanen Keratinozyten). Auffallend, der induktive Effekt durch 3-MC überlagerte diese Untersuchung weniger, als es beim NR- Test der Fall war. Die signifikante Verminderung der Lebensfähigkeit in Abb. 5.2.28 für 44h und 90h mit 3-MC ist hauptsächlich auf die ausgesprochen geringe Konfluenz des Zellrasens bei Versuchsbeginn zurückzuführen. Es zeigten sich unter dem Mikroskop keine Schäden an den Zellen. Der NR- Test wies bei prinzipiell gleichem Versuchsaufbau, allerdings mit 60%iger Konfluenz zu Versuchsbeginn, keine Anzeichen für toxische Einflüsse von 3-MC auf HaCaT- Zellen auf.



**Abb. 5.2.29:** Zytotoxizität von 3-MC an HaCaT- Keratinozyten, ermittelt über 72h durch MTT- Test

Abb. a): Versuchsbeginn bei 70%iger Konfluenz, HaCaT- Zellen P74 (Darstellung modifiziert nach [51])

Abb. b): Versuchsbeginn bei 100%iger Konfluenz, HaCaT- Zellen P48

Es erfolgte kein Mediumwechsel innerhalb der Inkubationszeit mit 3-MC. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 8 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0 $\mu$ M 3-MC stellt den Medium- Kontrollwert dar.

Eine Anwendung von 2 $\mu$ M 3-MC bis 90h ohne Mediumwechsel kann bei den Modellreaktionen erfolgen, ohne Schäden an den HaCaT- Zellen zu verursachen.

*Phenobarbital (PB)*: Dieser zur Induktion von Cytochrom-P450- Enzymen häufig eingesetzte Induktor wurde schon an Keratinozyten in 2mM-er Konzentration eingesetzt [159]. Für Hepatozyten finden sich Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der PB- Wirkungen, dabei wurde mit geringen Konz. von 0,1 bis 2mM [66], aber auch mit höheren Konzentrationen von bis zu 8mM gearbeitet [174]. In Bezug darauf wurde die MTT- Toxizität verschiedener Phenobarbital- Konzentrationen auf HaCaT- Zellen unterschiedlicher Konfluenz bis zu 90h untersucht. Die Tabelle 5.2.2 zeigt die ermittelten Ergebnisse. Im Gegensatz zu allen bisherigen Ergebnissen steht die geringere Lebensfähigkeit nach der Inkubation mit PB von 70%- konfluenten Zellen gegenüber 20%- konfluenten Zellen. Der Grund dafür könnte in der deutlich höheren Passage der HaCaT- Zellen (P74 gegenüber P37) liegen. Die ermittelten Daten werden durch die Literatur bestätigt, in der an humanen Keratinozyten über 48h und 4mM PB keine

Toxizität nachweisbar war [159].

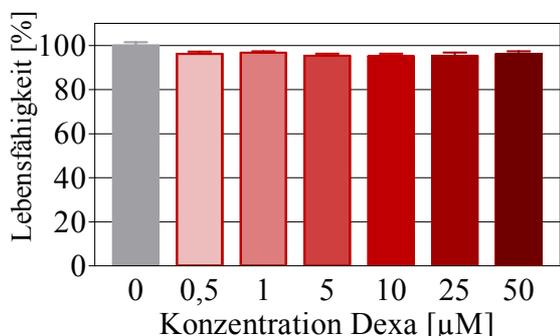
**Tab. 5.2.2:** Zytotoxizität von **Phenobarbital** an HaCaT- Keratinozyten mittels MTT- Test, Werte für 40% und 70% Konfl. aus [51]; Konfluenzangabe zu Versuchsbeginn

Konz. PB [mM]:	0	0,5	1	1,25	1,5	1,75	2	3	5	Inkub.-Zeit [h]	Konfl. [%]	Passage
Lebensfähigkeit [%]:	100,0		94,6							22	20	37
LF [%]:	100,0		96,0							44	20	37
LF [%]:	100,0	100,0	89,8	85,6	72,2	73,9	47,6	40,6	9,0	72	40	79
LF [%]:	100,0	91,7	88,1	86,9	82,8	81,0	80,1	66,4	45,7	72	70	74
LF [%]:	100,0		96,4							90	20	37

Der Einsatz von PB (1mM) kann in den Modellreaktionen ohne Bedenken bis 90h ohne Medienerneuerung erfolgen, denn es wurde keine signifikante MTT- Toxizität ermittelt. Bei der Untersuchung wurde weiter deutlich, dass im Gegensatz zu 3-MC die Lebensfähigkeit von PB 100% nicht überstieg. Wie oben angedeutet, scheint in diesem Fall die Konfluenz zu Versuchsbeginn eine geringere Rolle für die Ermittlung der LF zu spielen, dafür wirkte sich eine erhöhte Passagezahl negativ aus. Es sollten bei Verwendung von PB als Induktor für die Modellreaktionen HaCaT- Zellen mit niedriger Passage eingesetzt werden, geht dies nicht, dann ist die Inkubationszeit auf maximal 72h zu begrenzen.

*Clofibrat (Clo):* Der zu Charakterisierung der CYP 4A- vermittelten Reduktionen eingesetzte Induktor wurde bereits umfangreich von Dietrich, A. auf seine MTT- Toxizität an HaCaT- Keratinozyten getestet [51]. Für graphische Darstellungen sei an dieser Stelle darauf verwiesen. Zusammengefasst ist zu sagen, dass ein Einsatz von Clofibrat bis zu einer Endkonzentration von 350µM über 72h an unkonfluenten HaCaT- Zellen keine signifikanten Schädigungen hervorrief.

*Dexamethason (Dexa):* Die Untersuchung dieses Induktors für CYP 3A4 erfolgte entsprechend den Angaben in Kapitel 4.2.2. Das MTT- Reagens fand in einer 1:14- Verdünnung Anwendung, was einer Endkonzentration von 35,70µg/ml entsprach. Die Abbildung 5.2.30 gibt die ermittelten Werte der Lebensfähigkeit nach 53-stündiger Inkubation wieder.



**Abb. 5.2.30:** Zytotoxizität von **Dexamethason** an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test

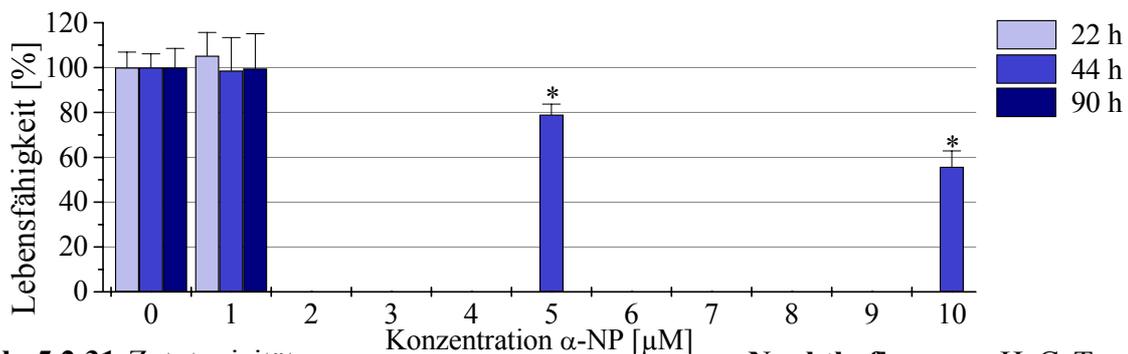
Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 50%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 15 Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Wert 0µM Dexa stellt den Medium- Kontrollwert dar.

In diesem Versuch konnte keine signifikante Toxizität von Dexamethason an halbkonfluenten HaCaT- Zellen beobachtet werden. Da auch mikroskopisch keine Veränderungen des Monolayers ersichtlich waren, wurde auf einen zweiten Versuch mit konfluenten Zellen verzichtet. Aus diesen und den Ergebnissen des NR-Testes ist zu folgern, dass die Verwendung von Dexamethason bis 50 $\mu$ M an konfluenten HaCaT- Zellen möglich ist. Bei geringerer Konfluenz sollte nur mit 25 $\mu$ M Dexamethason gearbeitet werden.

*Rifampicin (Rif)*: Die Toxizität von Rifampicin wurde mit dem MTT- Test zwar untersucht, erbrachte aber keine aussagekräftigen Ergebnisse. Der Grund dafür lag in der starken Eigenfärbung des Rifampicins, die die Absorption der gelösten Formazan- Kristalle überdeckte. Es wurden z.B. Lebensfähigkeiten von über 100% für 250 $\mu$ M Rifampicin bestimmt, was bei Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop sich nicht bestätigte, hierbei fielen deutlich toxische Effekte ab 100 $\mu$ M Rif auf. Unter zusätzlicher Beachtung der Ergebnisse aus Kapitel 5.2.1.3 ist festzuhalten, dass die Anwendung von Rifampicin an konfluenten HaCaT- Zellen bis 50 $\mu$ M möglich ist, aber besser darunter liegen sollte. Für 10 $\mu$ M Rif konnten selbst bei wenig konfluenten Zellen keine Schäden ermittelt werden.

#### 5.2.2.4 Inhibitoren

*$\alpha$ - Naphthoflavin ( $\alpha$ -NP)*:



**Abb. 5.2.31:** Zytotoxizität von  $\alpha$ -Naphthoflavin an HaCaT- Keratinozyten P37, ermittelt durch MTT- Test

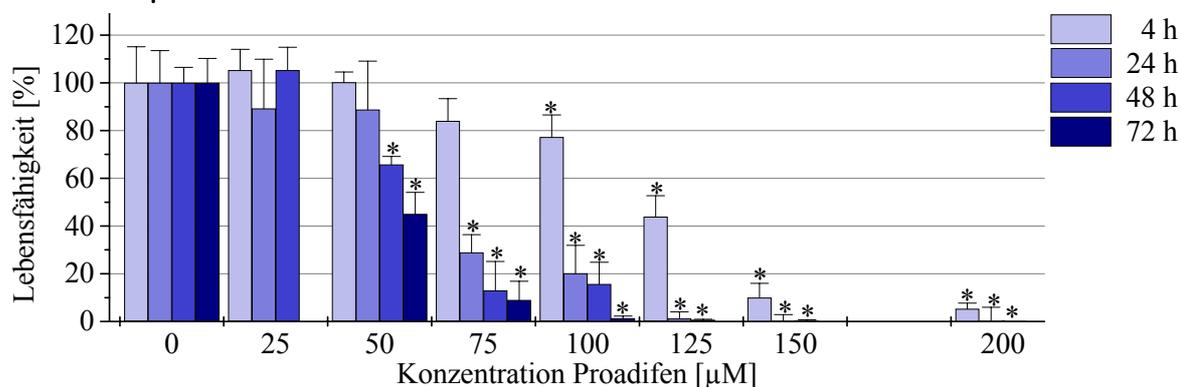
Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium. Die Konfluenz des Zellrasens entsprach zu Versuchsbeginn ca. 10%, nach 22h 20%, nach 44h 40% und nach 90h 80%. Es erfolgte kein Mediumwechsel innerhalb der Inkubationszeit mit  $\alpha$ -NP.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 24$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle  $\alpha$ -NP=0 $\mu$ M, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Abbildung 5.2.31 gibt die Werte der Lebensfähigkeit von HaCaT- Zellen nach Behandlung mit  $\alpha$ -NP wieder. Da in der Literatur schon mit UVB und  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) an HaCaT- Zellen gearbeitet wurde [200], sollte diese Konzentration auch in der vorliegenden Arbeit bevorzugt Verwendung finden und wurde zunächst bis 90h auf mitochondriale Toxizität untersucht. Für die Inkubationszeit von 44h erfolgte außerdem die Bestimmung der Toxizität nach  $\alpha$ -NP-Behandlung (5 $\mu$ M; 10 $\mu$ M). Es wird deutlich, dass für die HaCaT- Keratinozyten  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) problemlos bis 90h eingesetzt werden kann, dagegen ist auf Konzentrationen ab 5 $\mu$ M zumindest bei der Arbeit mit unkonfluenten Zellen zu verzichten. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Dietrich, A. [51] mit 80% Lebensfähigkeiten nach  $\alpha$ -NP (5 $\mu$ M)

und 42% LF nach  $\alpha$ -NP (10 $\mu$ M) jeweils über 72h, bei ebenfalls 40% Konfluenz zu Versuchsbeginn. In diesen Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass bei einer erhöhten Konfluenz von 70%,  $\alpha$ -NP (10 $\mu$ M) von den Zellen erwartungsgemäß besser toleriert wurde (77% LF nach 72h).

**Proadifen:** Bereits die vorangegangenen Untersuchungen von Proadifen in Kombination mit EC (Abb. 5.2.19 b) ließen für diesen Inhibitor erhebliche toxische Effekte erwarten. Die Ergebnisse des MTT- Testes in der nachfolgenden Abb. 5.2.32 bestätigten diese Erwartung. So wirkten sowohl die Steigerung der Proadifen- Konzentration, als auch längere Inkubationszeiten zunehmend toxischer auf die HaCaT- Zellen. Wurden bei 4-stündiger Inkubationszeit signifikante Schäden ab 100 $\mu$ M Proadifen beobachtet, traten diese bei 48-stündiger Inkubation schon mit 50 $\mu$ M Proadifen auf.



**Abb. 5.2.32:** Zytotoxizität von **Proadifen** an HaCaT- Keratinozyten P39 und P40, ermittelt durch MTT- Test

Die Zellzahl bei Aussaat betrug  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml in farblosem Medium. Die Konfluenz des Zellrasens entsprach zu Versuchsbeginn 40%, nach 48h ca. 80% und nach 72h 100%. Es erfolgte kein Mediumwechsel innerhalb der Inkubationszeit mit Proadifen. Die Werte für 25 $\mu$ M und 50 $\mu$ M wurden aus [51] übernommen.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 8 Experimenten, \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle Proadifen=0 $\mu$ M, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Da in der Literatur schon mit Konzentrationen von 100 $\mu$ M an humanen Keratinozyten gearbeitet wurde [159], überraschten die gefundenen Werte. So konnten in dieser Studie toxische Effekte erst ab 500 $\mu$ M Proadifen über 4h bestimmt werden - eine Konzentration, bei der in den eigenen Untersuchungen keine HaCaT- Zelle überlebte. So folgten weitere Versuche mit Substanzzugabe bei 70% und 100% Konfluenz. In diesen Fällen schwächte sich die Toxizität des Proadifen auf HaCaT- Zellen merklich ab (siehe Tabelle 5.2.3).

**Tab. 5.2.3:** Zytotoxizität von **Proadifen** an HaCaT- Keratinozyten mittels MTT- Test, Werte für 40% und 70% Konfluenz aus [51]; Konfluenzangabe zu Versuchsbeginn

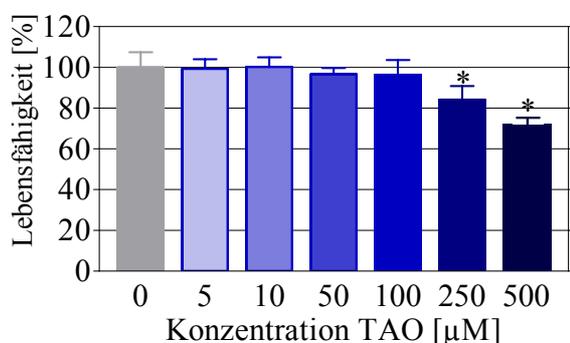
Konz. Proadifen [ $\mu$ M]:	0	50	75	100	150	250	Konfl. [%]	Inkub.-Zeit [h]	Passage
Lebensfähigkeit [%]:	100,0	65,8	15,6	12,9	0,04	0	40	48	40
Lebensfähigkeit [%]:	100,0	90,5	84,6	17,3	4,6	2,0	70	48	74
Lebensfähigkeit [%]:	100,0			30,2		7,8	100	48	58

Auch wenn eine erhöhte Konfluenz die Toxizität von Proadifen auf HaCaT- Zellen herabsetzte, sollte dieser Inhibitor für Inkubationszeiten von 48h und mehr nur bis 50 $\mu$ M verwendet

werden, evt. sogar noch darunter. Eine Verwendung von 2mM Proadifen, wie bei Untersuchungen an Keratinozyten [43], erscheint für HaCaT- Zellen viel zu toxisch. Allerdings wurden in selbiger Studie keine Toxizitätswerte genannt, sondern nur hemmende Effekte des Proadifen auf Monooxygenase- Aktivitäten belegt.

*Metyrapon*: Für die graphische Darstellung der MTT- Toxizität auf 70%-konfluente HaCaT- Zellen über 72h sei an dieser Stelle wieder auf die Arbeit von Dietrich, A. verwiesen [51]. Der Einsatz von Metyrapon bis zu 5µM erbrachte über diese Zeit keine signifikante Beeinträchtigung der Zellkultur.

*Triacetyloleandomycin (TAO)*: Die Untersuchung des potentiellen CYP3A4- Inhibitors TAO erfolgte nach den Angaben in Kap. 4.2.2. Wie schon oft zuvor, musste das MTT- Reagens 1:14 verdünnt eingesetzt werden. Da bisher eine Konfluenz von 100% gegenüber 50% immer zu verminderter Toxizität führte, wurde in dieser Untersuchung nur eine Testung und zwar an 70%ig konfluenten HaCaT- Zellen durchgeführt. Die Abb. 5.2.33 zeigt die Test- Ergebnisse.



**Abb. 5.2.33:** Zytotoxizität von **Triacetyloleandomycin** an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test

Die Konfluenz des Zellrasens lag zu Versuchsbeginn bei 70%. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 16$  Experimenten, \* $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Der Wert 0µM TAO stellt den Medium- Kontrollwert dar

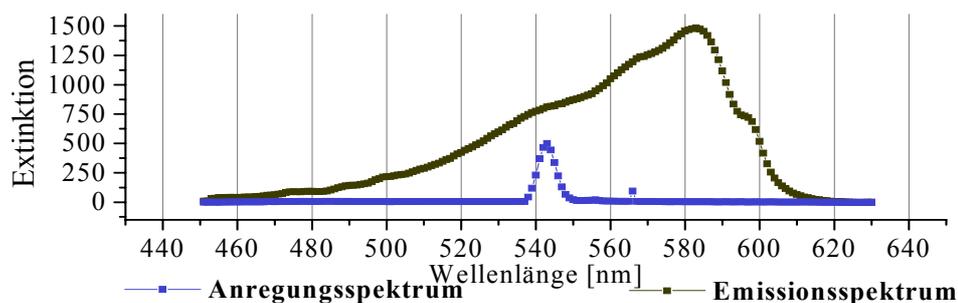
Die signifikante Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit bei 250µM und 500µM TAO fiel vor allem durch reduziertes Zellwachstum und dementsprechend geringen Medienverbrauch auf. Mikroskopisch war nur für 500µM TAO eine beginnende Abrundung der HaCaT- Zellen zu beobachten. Bis 100µM kann der Inhibitor TAO für mindestens 53h eingesetzt werden, ohne die HaCaT- Zellen merklich zu schädigen.

Es wird an dieser Stelle darauf verwiesen, dass die MTT- Toxizitäten im Zusammenhang mit der UV- Bestrahlung in den dortigen Kapiteln Erläuterung finden (ab Kapitel 5.3.1.4).

## 5.3 Bestimmung der Enzymaktivität

### 5.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

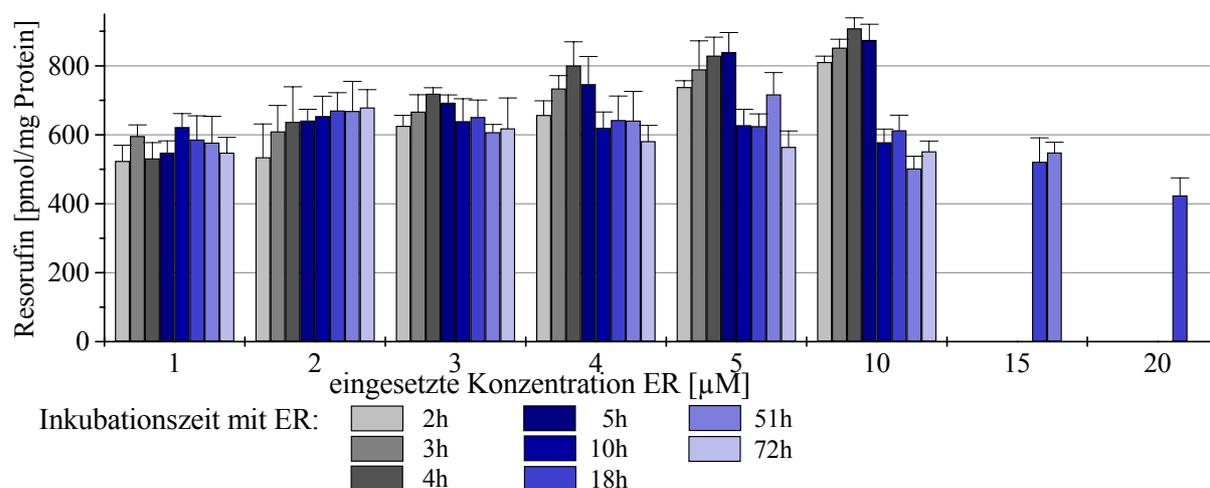
Zunächst wurde für das durch die EROD entstehende Produkt Resorufin mit Hilfe eines Fluoreszenz- Spektrophotometers ein Anregungs- und Emissionsspektrum aufgezeichnet (Reso 1  $\mu\text{M}$  in Medium B). Das Extinktionsmaximum der Anregung lag bei 543 nm, das der Emission bei 583 nm, somit stand der weiteren Verwendung der Excitations-/ Emissionsfilter von 544/ 590 nm nichts entgegen. Die Abb. 5.3.1 gibt das ermittelte Spektrum wieder.



**Abb. 5.3.1:** Spektren von Resorufin (1  $\mu\text{M}$ ) nach Vermessung in DMEM (Medium B)

#### 5.3.1.1 Bestimmung der Grundaktivität

Die Durchführung aller Versuche zur Ermittlung der Grund- bzw. Basalaktivität der HaCaT-Keratinocyten richtete sich nach den Angaben im Methodenteil unter Kap. 4.3.1.3 a).

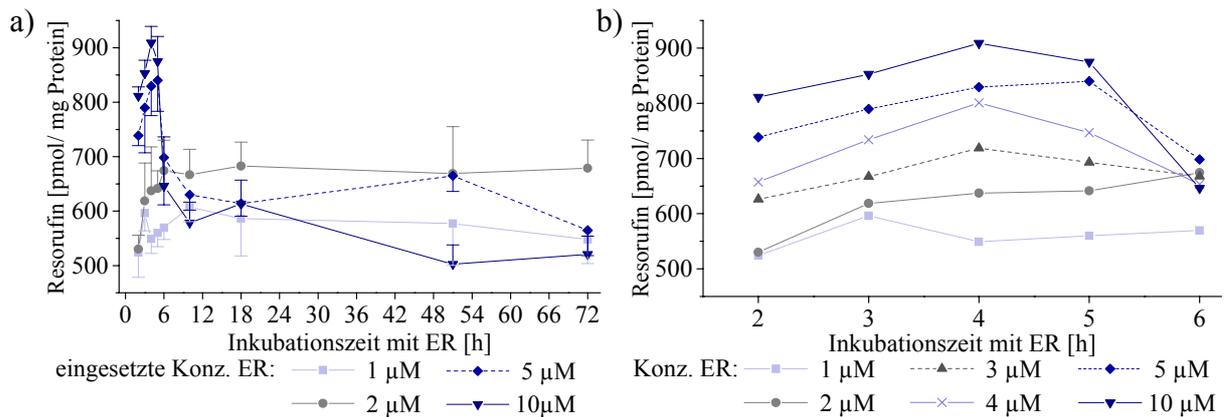


**Abb. 5.3.2:** 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT-Keratinocyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der ER-Konzentration

Versuchsbeginn bei einsetzender Konfluenz. Über die gesamte Inkubationszeit erfolgte kein Mediumwechsel. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da es sich um die Werte aus fünf verschiedenen Versuchen handelt, wodurch sich für die einzelnen ER-Konzentrationen  $n = 5$  bis  $n = 27$  Experimente ergaben.

Die Abb. 5.3.2 macht deutlich, dass neben der eingesetzten Konzentration des Substrates auch die Inkubationszeit eine wesentliche Rolle bei der EROD spielte. Lagen für 1  $\mu\text{M}$  ER die Produktmengen bei allen Zeiten zwischen 500 und 600 pmol Resorufin/mg Protein, gab es bei Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  ER Schwankungen von ca. 900 pmol Reso/mg Protein bei 4-stündiger Inkubation bis 500 pmol Reso/mg Protein bei 51-stündiger Inkubation. Es fällt außerdem auf, dass mit steigender Konzentration ER bei längeren Inkubationszeiten die Produktmenge zu-

nächst stagniert, später abnimmt. Zu beobachten ist dieser Effekt ungefähr ab  $4\mu\text{M}$  ER über 10-stündige Inkubation. Ein Vergleich mit Abb. 5.2.18 (MTT- Untersuchung von ER) liefert die dafür wahrscheinliche Erklärung. Bei Behandlung von ER ( $10\mu\text{M}$ ) über 72h sank die Lebensfähigkeit der Zellen auf ca. 70%, für die ER- Deethylierung ergab sich dadurch ein Mittelwert von  $550\text{ pmol Reso/mg Protein}$  – nahezu der gleiche Wert wie bei Einsatz von  $1\mu\text{M}$  ER ( $548\text{ pmol Reso/mg Protein}$ ) über denselben Zeitraum. Der nicht in den Toxizitätstest untersuchte Einsatz von  $20\mu\text{M}$  ER schädigte die Zellen sehr stark, was schon nach kurzer Zeit unter dem Lichtmikroskop zu erkennen war, dementsprechend verloren die Zellen auch an metabolischer Aktivität. Auf die in der Literatur häufige Angabe von Menge Produkt je mg Protein *und* Zeit wurde bewusst verzichtet. Die Abb. 5.3.3 verdeutlicht den Grund dafür.



**Abb. 5.3.3:** 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit ER

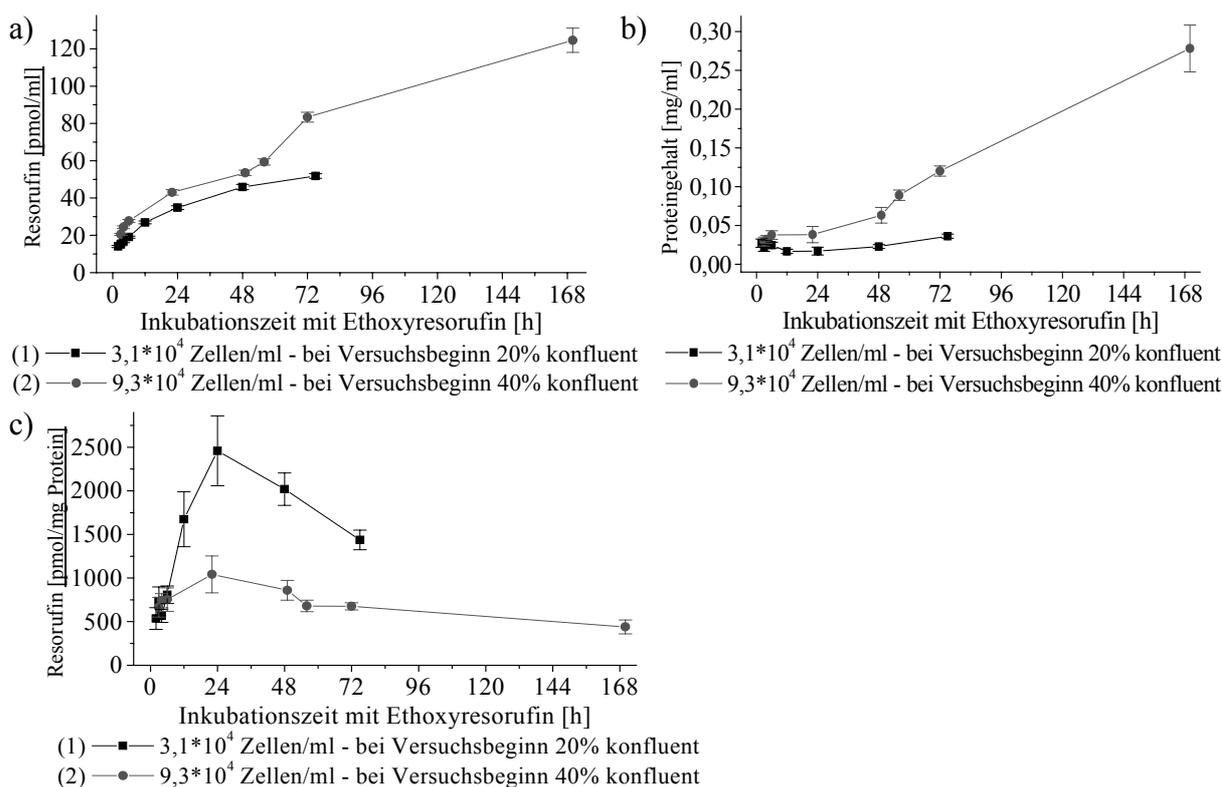
a) Darstellung 4 verschiedener Konzentrationen ER über 72h

b) Darstellung 6 verschiedener Konzentrationen ER über 6h [Ausschnitt aus a)]

Dargestellt sind in a) die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 4$  bis  $n = 21$  Experimenten, in b) wurde auf die Darstellung der Standardabweichung zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Der Bezug von Resorufin je mg Protein je Zeiteinheit setzt eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten ER- Konzentration und der gebildeten Menge Produkt voraus. In der Praxis kann von dieser Linearität insbesondere bei Inkubationszeiten, die über mehrere Tage dauern, nicht ausgegangen werden (siehe Abb. 5.3.3 a). Wie Abb. 5.3.3 b) verdeutlicht, ist eine Linearität in der 7-EROD an HaCaT- Zellen nur bis zur maximal 4-stündigen Umsetzung gegeben. Da viele Autoren die Produktmenge auf die Zeit beziehen, erschwert es den direkten Vergleich zu den vorliegenden Werten. Wie bereits für Keratinozyten festgestellt, ist es aufgrund der variierenden Methodik schwer, die Ergebnisse verschiedener Autoren zu vergleichen [20]. Anhand eines Versuches der EROD mit HaCaT- Zellen geringer Konfluenz konnte die Problematik der Einbeziehung des Proteingehaltes in die Umsatzmenge Resorufin veranschaulicht werden. So gibt die Abb. 5.3.4 a) die Menge an gebildetem Resorufin für zwei unterschiedlich dicht ausgesäte Versuche wieder. Die dazugehörige Abb. b) veranschaulicht den Proteingehalt der Versuche und in der Abb. c) ist die gebildete Resorufinmenge auf den Proteingehalt aus b) bezogen dargestellt. Die Konfluenz zu Versuchsbeginn betrug  $3,1 \times 10^4$  Zellen/ml oder  $9,3 \times 10^4$  Zellen/ml. Im ersten Fall wurde über den Versuchszeitraum von 75h keine 100%ige Konfluenz des Zellrasens erreicht, im zweiten Fall stellte sich diese nach ca. 60h ein.

Aus den drei Darstellungen in Abb. 5.3.4 geht hervor, dass der Proteingehalt trotz Konfluenz weiter stark steigt, auch die Menge an gebildetem Resorufin erfährt über die Zeit der Inkubation eine Zunahme. Bezieht man aber die Resorufin-Menge auf den Proteingehalt, ergibt sich ein Maximum, welches bei ca. 20h liegt. Ferner erscheint für den Versuch (1) die geringere Menge an Reso durch den Bezug auf eine ebenfalls geringere Proteinmenge gegenüber (2) im Kombinationsdiagramm c) mit der deutlich größeren Menge an Resorufin je mg Protein. Dies verdeutlicht den Einfluss, den der Proteingehalt der Proben auf die Darstellung der Ergebnisse in der Form „Produktmenge je mg Protein“ hat.



**Abb. 5.3.4:** 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit ER für 2 verschiedene Aussaatdichten

a) Darstellung gebildeten Resorufinmenge in pmol/ml

b) Darstellung des zu a) gehörenden Proteingehaltes in mg/ml

c) Darstellung der gebildeten Resorufinmenge in pmol/mg Protein

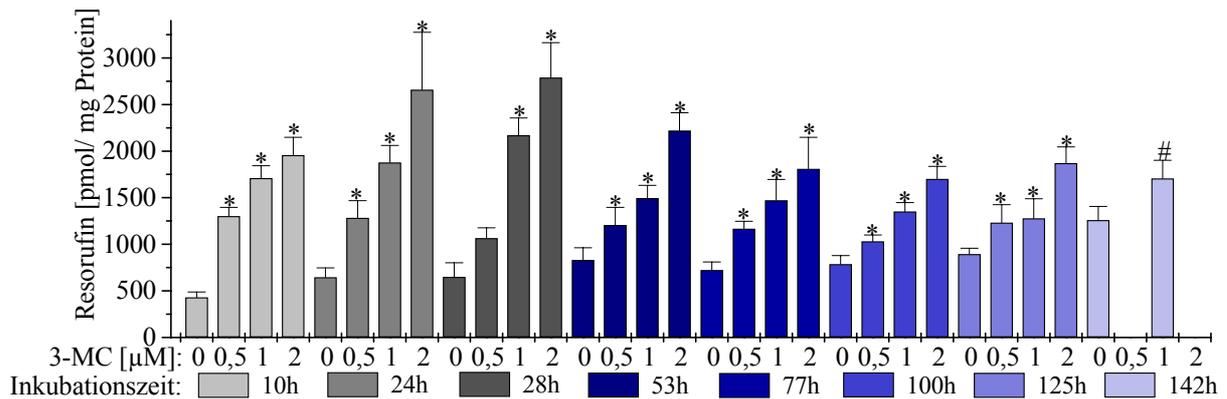
Erreichen der 100%igen Konfluenz nach 60h (2), bei (1) über die Versuchsdauer keine Konfluenz. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 8 Experimenten.

Auf diese Erkenntnisse aufbauend, wurde in der Folge den Zellen ER meist mit beginnender Konfluenz zugesetzt und fast ausnahmslos 24h mit dem Substrat inkubiert. Es fand überwiegend ER in 2 $\mu$ Mer Konzentration Anwendung.

### 5.3.1.2 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren

Zunächst wurden mit dem für CYP 1A1/A2 relativ spezifischem INDUKTOR 3- Methylcholanthren (3-MC) [42;48;159] umfangreiche Tests zur induktiven Kapazität der HaCaT- Zellen unternommen. Dabei wurde der Einfluss der Passagezahl, die Konfluenz bei Versuchsbeginn und die Inkubationszeit mit 3-MC untersucht. Für alle Versuche blieb die Zeit mit dem Substrat 7-ER konstant bei 24h. Der prinzipielle Ablauf der Testungen ist unter 4.3.1.3 b) be-

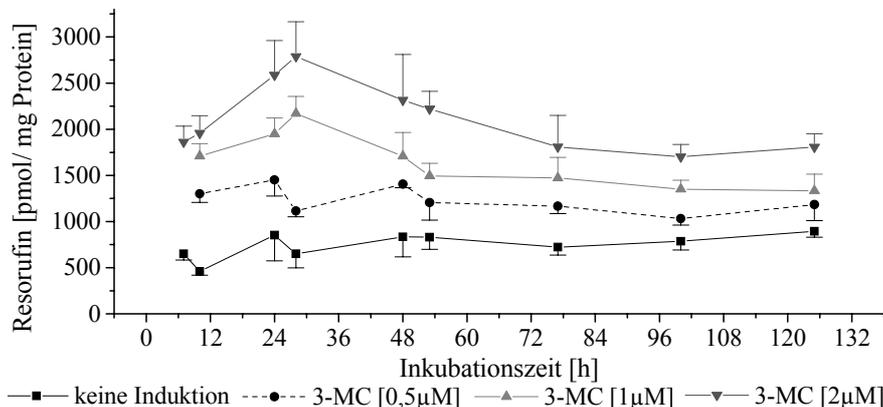
schrieben. Die Abb. 5.3.5 veranschaulicht die durch den Induktor 3-MC ausgelöste Induzierbarkeit des CYP 1A1/A2 in HaCaT- Zellen. Dabei wird deutlich, dass die Konzentration des 3-MC und dessen Inkubationszeit einen Einfluss auf die Umsetzung haben. Die maximale Resorufinmenge konnte nach 28h-stündiger Induktion mit 2 $\mu$ M 3-MC ermittelt werden und lag bei 2788 pmol Resorufin/mg Protein. Nahezu jede Konzentration 3-MC führte in den untersuchten Zeiten zu einer signifikanten Steigerung der Resorufinbildung gegenüber den nicht induzierten Zellen. Dagegen hatte das Arbeiten mit verschiedenen Passagen keinen Einfluss auf Induktion und EROD.



**Abb. 5.3.5:** 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion durch 3-Methylcholanthren; ER(2 $\mu$ M; 24h)

Versuchsbeginn bei einsetzender Konfluenz mit der Zugabe von 3-MC. Untersuchung verschiedener Passagen, dargestellt: P36 (125h); P37 (28h, 53h, 77h, 100h); P82 (24h, 142h); P83 (10h). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 6 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrolle (0 $\mu$ M 3-MC); einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Induktor- Konzentrationen gibt Abb. 5.3.6 wieder.



**Abb. 5.3.6:** EROD an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion mit 3-Methylcholanthren; Abhängigkeit von Induktor- Konzentration und Induktionszeit; ER(2 $\mu$ M; 24h)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 6 Experimenten.

Für das Arbeiten mit 0,5 $\mu$ M 3-MC ergab sich bei 10h eine 2,8-fache, bei 24h eine 1,7-fache und für 100h/125h eine 1,3-fache Resorufin- Menge gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei der Verwendung von 3-MC (1 $\mu$ M) erreichte die Induktion nach 10 Stunden das 3,7-fache und endet bei 125h mit einer 1,5-fachen Induktion gegenüber der Kontrolle. Auf einem noch höherem Induktionsniveau befanden sich die Werte für 3-MC (2 $\mu$ M) mit 4,2-facher Erhöhung für 10h, 3,7fach für 24h bis hin zu 2fach nach 125h-stündiger Induktion. Ebenso wie die

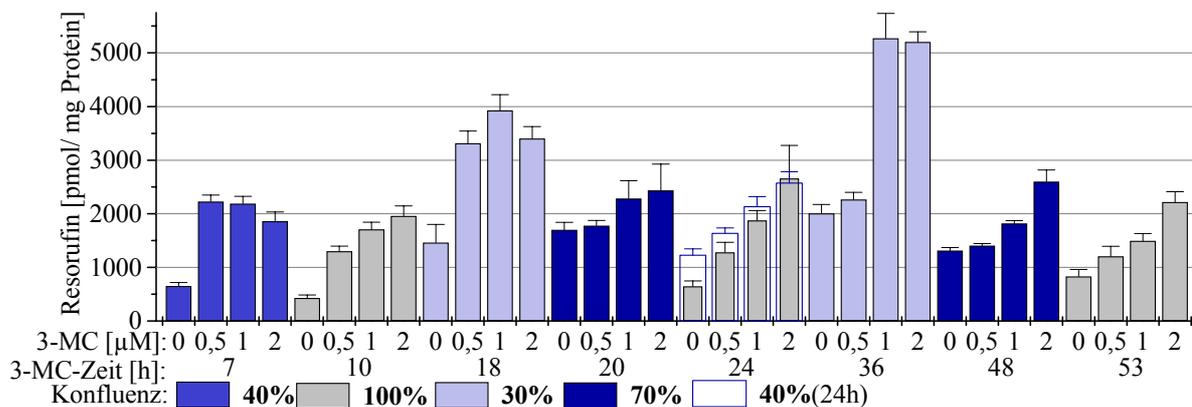
maximale Menge an Resorufin war bei 28h Induktion mit 2 $\mu$ M 3-MC der Faktor der Erhöhung über das Kontrollniveau, mit 4,3facher Induktion am größten. Die folgende Tabelle 5.3.1 zeigt einige ausgewählte Werte in Form von Faktor der Erhöhung nach 3-MC-Induktion.

**Tab. 5.3.1:** Darstellung der x-fachen Induktion des CYP1A1/A2 charakterisiert durch EROD und 3-MC- Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ER(2 $\mu$ M; 24h)

Induktionszeit [h]:	10	24	28	48	100	125
0,5 $\mu$ M 3-MC	<b>2,83</b>	<b>1,70</b>	<b>1,72</b>	<b>1,68</b>	<b>1,31</b>	<b>1,32</b>
1 $\mu$ M 3-MC	<b>3,71</b>	<b>2,99</b>	<b>3,34</b>	<b>2,05</b>	<b>1,72</b>	<b>1,49</b>
2 $\mu$ M 3-MC	<b>4,25</b>	<b>3,74</b>	<b>4,30</b>	<b>2,77</b>	<b>2,17</b>	<b>2,02</b>

Die bisherigen Betrachtungen wurden ausschließlich an HaCaT- Zellen durchgeführt, bei denen sich zu Versuchsbeginn die Konfluenz gerade einstellte. Für 3-Methylcholanthren sollte aufgrund der bisher deutlich ausgeprägten Induktionswirkung auch das Verhalten auf Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase untersucht werden.

Wie sich die Induktion mit 3-MC gegenüber konfluenten Zellen auswirkte, zeigt die Abb. 5.3.7. Bei der Arbeit mit unkonfluenten HaCaT- Zellen ergab sich ein sehr heterogenes Bild. Dabei ließen sich dennoch einige grundsätzliche Tendenzen ermitteln. Je geringer die Konfluenz, umso stärker der induktive Effekt des 3-MC. Dabei spielte die schon für Abb. 5.3.4 angesprochene Form der Darstellung „Produktmenge je mg Protein“ eine große Rolle. Die niedrige Zelldichte, insbesondere bei den kurzen Induktionszeiten, ergab zwangsläufig geringe Proteingehalte. Die Ermittlung von Resorufin/ml erbrachte mit fortschreitender Zeit eine kontinuierliche Zunahme, so dass für Versuche mit geringer Konfluenz *und* kurzer Induktionszeit die Menge Resorufin/ mg Protein sehr stark erhöht erschien (vgl. Abb. 5.3.7 -18h 3-MC).



**Abb. 5.3.7:** EROD an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion mit 3-Methylcholanthren; Einfluss der Konfluenz zu Versuchsbeginn; ER (2 $\mu$ M; 24h)

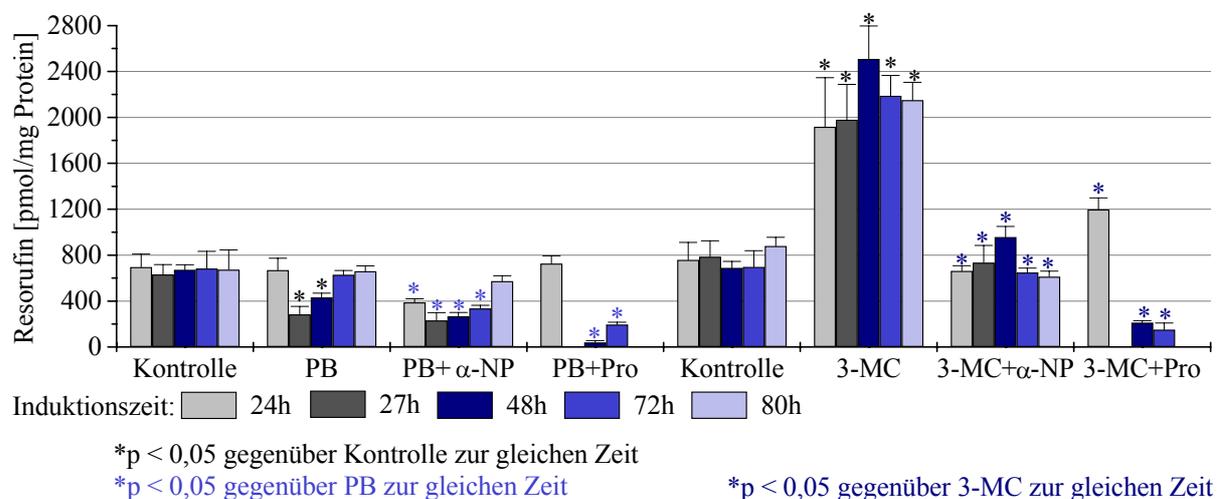
Versuchsbeginn bei der angegebenen Konfluenz mit der Zugabe von 3-MC. Untersuchung verschiedener Passagen, dargestellt: P35 (20h, 48h); P36 (18h, 36h); P37 (53h); P50 (7h, 24h-farblose Balken); P82 (24h-graue Balken); P83 (10h). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 6 Experimenten angegeben.

Ein weiterer Unterschied zu konfluenten Zellen konnte in der Induktionswirkung von 3-MC (1 $\mu$ M) verglichen mit 3-MC (2 $\mu$ M) festgestellt werden. Lag die Menge Resorufin gebildet nach Induktion mit 3-MC (2 $\mu$ M) bei 100%iger Konfluenz zu Versuchsbeginn im Mittel um den Faktor 1,3 über der geringeren 3-MC-Konz., so ergaben sich bei unkonfluentem Zellrasen für 3-MC (2 $\mu$ M) niedrigere Resorufin- Werte als mit 1 $\mu$ M 3-MC-Induktion. Mit zunehmender

der Induktionszeit und steigender Konfluenz nahm mit der Steigerung der 3-MC-Konzentration die Produktmenge an Resorufin annähernd linear zu.

Als weiterer INDUKTOR wurde *Phenobarbital* (PB) untersucht, der als hauptsächlich spezifisch für die CYP 2B- Familie gilt [171]. Es sind aber auch Induktionen von CYP 2A, 2C, 3A1 und 3A6 beschrieben [93]. Ob PB ebenfalls Auswirkungen auf die 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Zellen hat, sollte untersucht werden. Zum Vergleich wurde 3-MC unter gleichen Bedingungen eingesetzt und in der Folge die Wirkung der INHIBITOREN  $\alpha$ -Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) und *Proadifen* (Pro) getestet.

Die linke Seite der Abb. 5.3.8 zeigt, dass für PB (1mM) keine induktiven Effekte auf die EROD an HaCaT- Keratinozyten nachgewiesen werden konnten. Bei Induktionszeiten mit PB von 24h und 27h lagen die gemessenen Resorufin- Werte sogar signifikant unter den jeweiligen unbehandelten Kontrollwerten. Zu keiner Zeit ergaben sich für PB- inkubierte Zellen größere Resorufin- Mengen gegenüber den mit Medium behandelten Kontrollen. Die nachfolgende Behandlung der PB- induzierten Zellen mit  $\alpha$ - NP verringerte die gebildete Resorufin- Menge zusätzlich. Die Zugabe von Proadifen zu 24h mit PB induzierten Zellen zeigte keine Veränderung in der Resorufin- Menge, 48h und 72h mit PB induzierte Zellen erbrachten bei gleicher Proadifenbehandlung signifikant niedrigere Reso- Werte. Es lässt sich an dieser Stelle nicht ausschließen, dass diese Reduktion des Resorufinspiegels zumindest anteilig durch die Zytotoxizität des Proadifens hervorgerufen wurde.



**Abb. 5.3.8:** EROD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren oder Phenobarbital; nachfolgend Hemmung durch  $\alpha$ - Naphthoflavon oder Proadifen

Konfluenz zu Versuchsbeginn 20%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), Pro (100 $\mu$ M); ER (2 $\mu$ M). Die Induktionszeiten sind im Diagramm angegeben, Inhibition und ER in allen Fällen 24h.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 bis n = 17 Experimenten dargestellt. Durchgeführt wurde der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben dabei wurde verglichen: PB bzw. 3-MC gegen Kontrolle (\*); PB + Inhibitor gegen PB (\*) und 3-MC + Inhibitor gegen 3-MC (\*) jeweils für die gleiche Zeit.

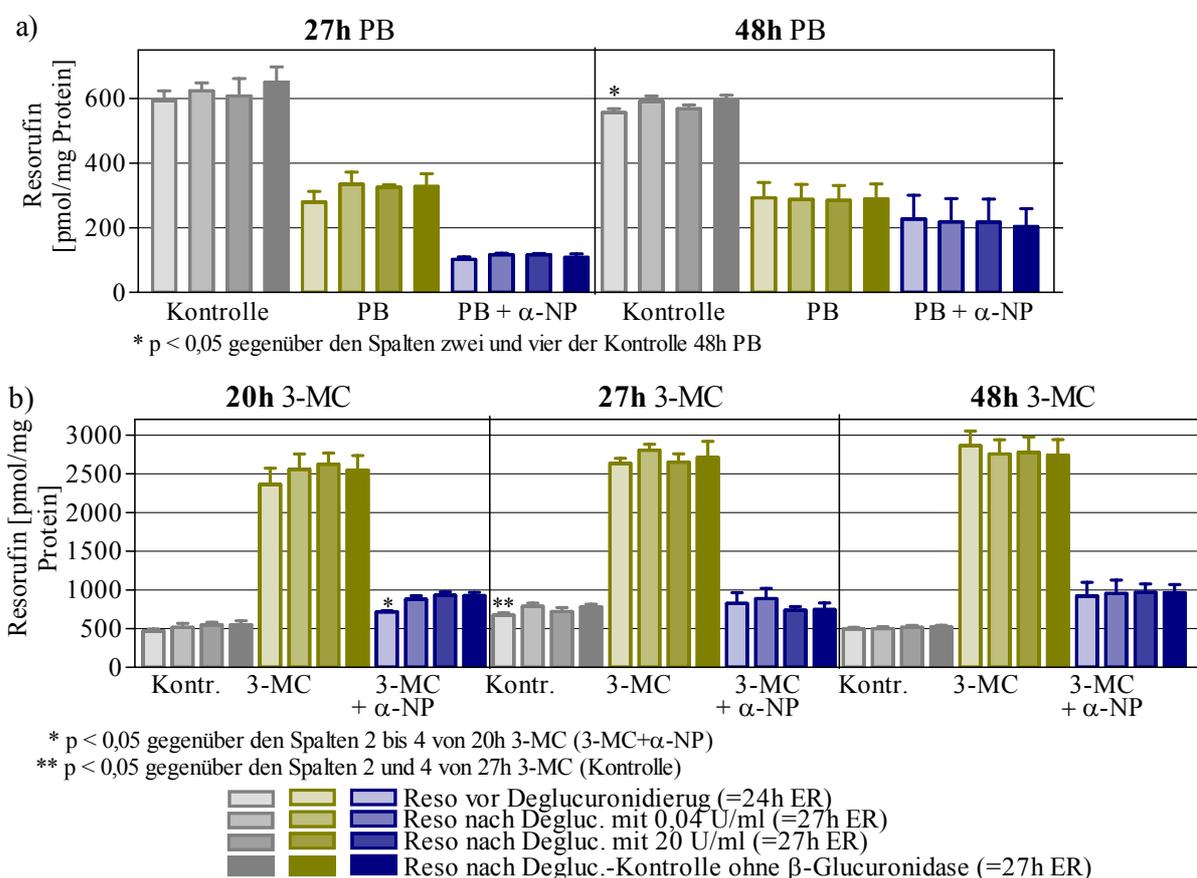
Die obige Abbildung 5.3.8 zeigt auf der rechten Seite die durch 3-MC hervorgerufene und EROD charakterisierte signifikante Induktion des CYP 1A1/A2, die sich in der Folge durch Inhibition mit  $\alpha$ - NP (1 $\mu$ M; 24h) auf das Kontrollniveau herabsetzen ließ. Durch Proadifen konnte die Resorufin- Menge gegenüber 3-MC- induzierten Zellen ebenfalls signifikant he-

rabgesetzt werden. Da auch hier die Werte zum Teil weit unter dem Kontrollniveau lagen, sind toxische Einflüsse des Proadifens wahrscheinlich.

### 5.3.1.3 Phase-II- Reaktionen (Glucuronidierung- / Sulfatierung)

Es sollte untersucht werden, ob und inwieweit die bisher ermittelten Umsätze von ER zu Resorufin der Gesamtmenge an freiem Resorufin entsprachen, oder ob anteilig das gebildete Resorufin weiter glucuronidiert bzw. sulfatiert wurde. Die genaue Durchführung der Versuche ist unter Kapitel 4.3.1.3 c) erläutert.

In den nachfolgenden Abb. 5.3.9 a) und b) sind die Ergebnisse der Deglucuronidierung/-sulfatierung nach Induktion mit 3-MC oder PB, Inhibition mit  $\alpha$ -NP und 7-Ethoxyresorufindeethylierung dargestellt. Auf eine Untersuchung des Inhibitors Proadifen wurde aufgrund seiner bisher ermittelten Toxizität gegenüber HaCaT- Keratinozyten verzichtet. Wird im Folgenden nur von Deglucuronidierung oder Glucuronidase gesprochen, so schließt dies immer die Sulfatase ein, da bei den Untersuchungen mit einem Gemisch aus beiden gearbeitet wurde (siehe Chemikalien – Kap. 4.8).



**Abb. 5.3.9:** EROD an HaCaT mit/ohne anschließender Deglucuronidierung/-sulfatierung

a) Induktion mit Phenobarbital 24h bzw. 48h und Hemmung durch  $\alpha$ - Naphthoflavin

b) Induktion mit 3-Methylcholanthren 20h, 27h, 48h und Hemmung durch  $\alpha$ - Naphthoflavin

Konfluenz zu Versuchsbeginn 60%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Zeit mit  $\alpha$ -NP und ER in allen Versuchen 24h. Zeit der Deglucuronidierung/-sulfatierung 3h.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 5$  Experimenten dargestellt; statistische Auswertung per einseitiger ANOVA und Bonferroni's multiplem Vergleichstest. Es wurden verglichen: Werte vor Degluc. mit 0,04U/ml und ohne Degluc. nach 27h ER

Für PB ergab sich ein ähnliches Bild nach der Deglucuronidierung wie ohne  $\beta$ -Glucuronida-

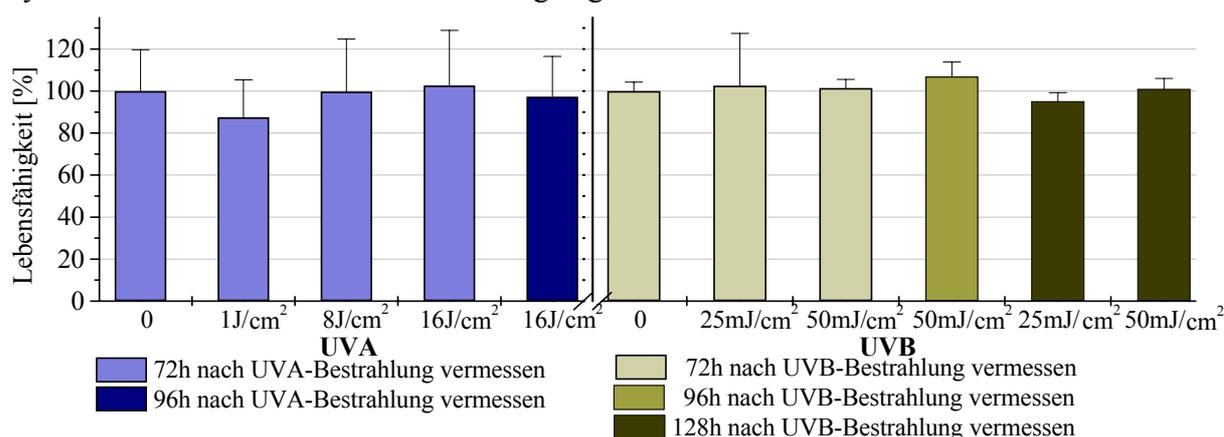
se- Behandlung. Es konnten keine induktiven Effekte belegt werden, die ermittelten Resorufin- Werte lagen im Bereich von denen aus Abb. 5.3.8. Es zeigten sich in keiner Gruppe statistische Unterschiede zwischen den mit 0,04 U/ml, den mit 20 U/ml und den ohne  $\beta$ -Glucuronidase behandelten Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den bisher dargestellten Resorufin- Werten um die Gesamtmenge an Resorufin handelt, da eine Umwandlung in Phase-II-Metabolite nicht stattfand.

Die Deglucuronidierung/-sulfatierung nach 3-MC- Induktion und EROD bestätigte, dass die HaCaT- Zellen Resorufin über diese beiden Phase-II-Reaktionen nicht weiter umsetzen. Die Werte in Abb. 5.3.9 b) sind vergleichbar mit allen bisher unter 3-MC- Induktion erhaltenen. Auch hier konnte statistisch kein Nachweis erbracht werden, dass eine Umsetzung mit  $\beta$ -Glucuronidase zu einer höheren Produktmenge Resorufin führt.

#### 5.3.1.4 Einfluss von UVA- Strahlung

Bei vorangegangenen Arbeiten mit der gleichen Bestrahlungskammer wurde bestimmt, dass UVA- Dosen von 1 J/cm<sup>2</sup> einem Aufenthalt im Freien an einem sommerlich, sonnigen Tag von ca. 5 min entsprechen. Für 8 J/cm<sup>2</sup> ergaben sich 30 bis 45min und für 16 J/cm<sup>2</sup> hätte man sich 55 bis 90 min im Freien aufhalten können. Dabei entsprachen die niedrigen Werte einem völlig wolkenlosen Himmel, die höheren Werte einem heiteren Himmel mit sehr wenigen Wolken [158]. Andere Arbeitsgruppen gingen in der UVA- Strahlendosis auf HaCaT mit 25,3 J/cm<sup>2</sup> [50] und 40 J/cm<sup>2</sup> [128] noch darüber hinaus. Es wurden in einer anderen Studie sogar 48,5 J/cm<sup>2</sup> UVA an HaCaT- Zellen eingesetzt [102].

Nachdem mittels MTT- Test sichergestellt war, dass die entsprechenden UVA- Dosen auf die HaCaT –Zellen nicht toxisch wirkten (Abb. 5.3.10), konnte mit den Untersuchungen des enzymatischen Verhaltens nach Bestrahlung begonnen werden.



**Abb. 5.3.10:** Zytotoxizität nach Bestrahlung mit UVA (P53) und UVB (P48) an konfluenten HaCaT- Keratinozyten mittels MTT- Test

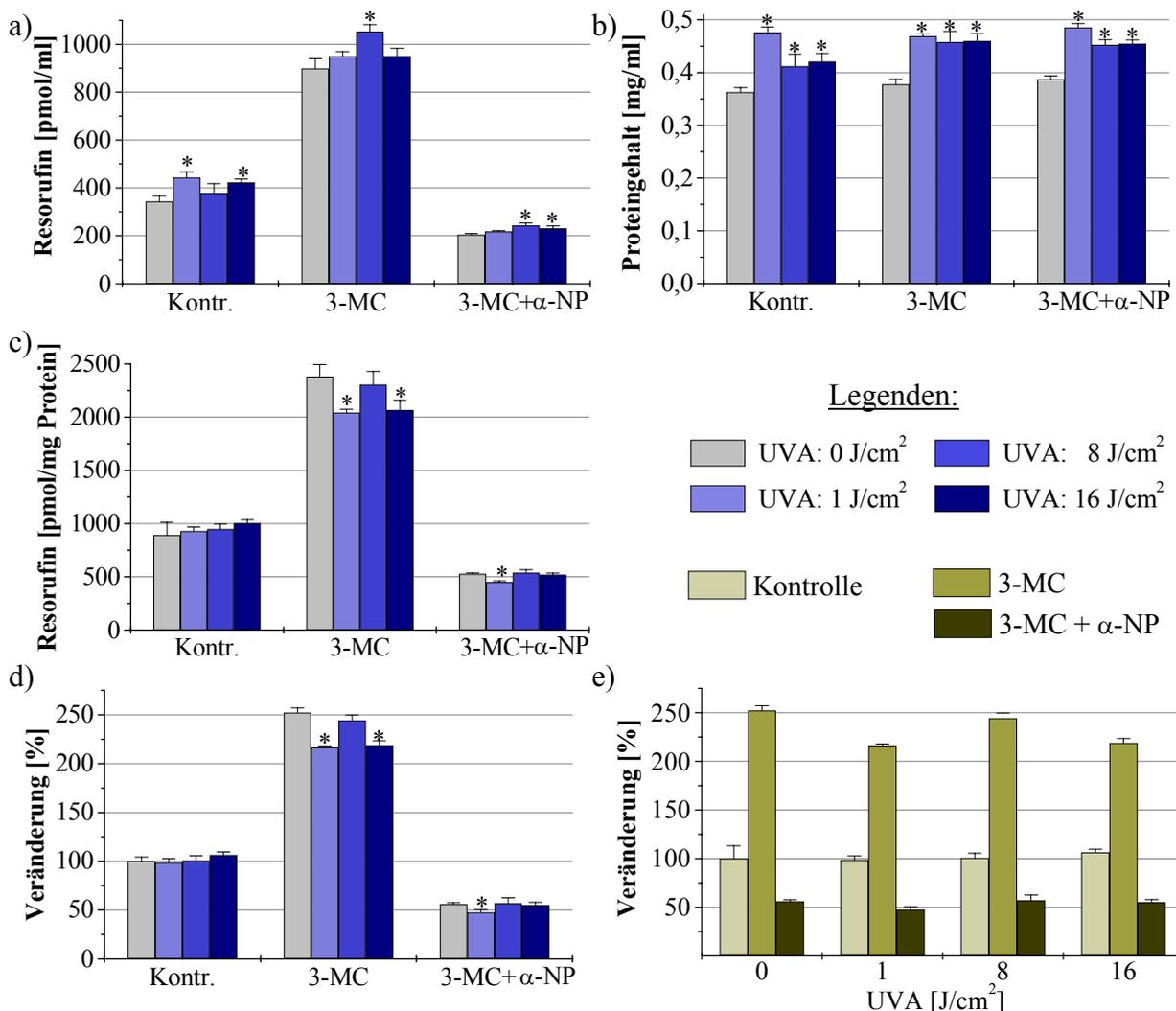
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 12 Experimenten, die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  jeweils gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (0J/cm<sup>2</sup> bzw. 0mJ/cm<sup>2</sup>).

#### a) EROD nach UVA- Bestrahlung

Der Versuchsablauf ist unter Kap. 4.3.1.3 d) genauer beschrieben, Angaben zur Bestrahlung finden sich im Kap. 4.5.1. Das Anliegen der Versuche war es, herauszufinden, wie bzw. ob mit UVA- Strahlung vorbehandelte (vorgeschädigte) HaCaT- Zellen ihr metabolisches Ver-

halten gegenüber sonst gleich behandelten Zellen verändern. Für diese Versuche wurde als Induktor nur 3-MC über zwei Induktionszeiten eingesetzt, da für PB bisher keinerlei CYP1A-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Als Inhibitor fand in allen Fällen  $\alpha$ -NP ( $1\mu\text{M}$ ) für 24h Verwendung. Die Zeit mit dem Substrat ER ( $2\mu\text{M}$ ) betrug ebenfalls immer 24h.

In der nachfolgenden Abb. 5.3.11 sind die Ergebnisse nach UVA- Bestrahlung und 24h Induktion dargestellt. Anhand der einzelnen Darstellungen lassen sich unterschiedliche Effekte beobachten. In Bild a) ist zu erkennen, dass, wie bisher, die Werte für 3-MC- Induktion signifikant über den Kontrollwerten lagen. Durch nachfolgende  $\alpha$ -NP- Hemmung sanken die Werte unter das Kontrolllevel. Eine besonders auffällige Beobachtung gibt Bild b) wieder. Die Proteingehalte aller bestrahlten Zellen lagen signifikant über der jeweils mitgeführten Kontrolle ohne UVA, dabei war die Bestrahlung mit  $1\text{ J/cm}^2$  sowohl in der Medium- Kontrollgruppe als auch in den mit 3-MC +  $\alpha$ -NP behandelten Zellen signifikant den mit 8 und 16  $\text{J/cm}^2$  bestrahlten Zellen überlegen.

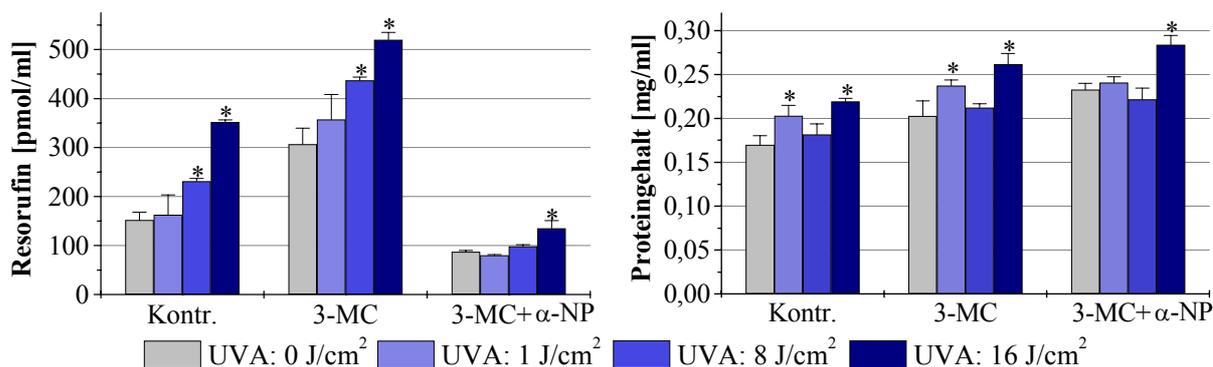


**Abb. 5.3.11:** EROD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch

3-Methylcholanthren (24h) und anschließender Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin. Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -NP ( $1\mu\text{M}$ ), ER ( $2\mu\text{M}$ ). Induktion, Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Die Abb. der prozentualen Veränderungen in d) und e) beziehen sich auf die Kontrollgruppen unbestrahlt, ohne Induktor, ohne Inhibitor, zugrunde liegen die Werte Reso (pmol/mg Protein). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 5$  Experimenten dargestellt; \* $p < 0,05$  gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Wie schon für Abb. 5.3.4 angesprochen, ergab sich aufgrund des Einflusses der Proteingehalte für Reso in Bild c) eine andere Darstellung gegenüber Bild a). Aufgetragen als Resorufin (pmol/mg Protein) war kein Wert aus den Bestrahlungsversuchen der Kontrolle signifikant überlegen, vereinzelt ergaben sich sogar niedrigere Resorufinspiegel in Bezug auf die jeweilig unbestrahlten Zellen. Der Überblick der verschiedenen Strahlendosen in Abb. 5.3.11 e) verdeutlicht, dass die einmalige UVA- Strahlung bis  $16 \text{ J/cm}^2$  das fremdstoffmetabolische Verhalten von HaCaT- Zellen 72h nach der Bestrahlung, charakterisiert durch Ethoxyresorufin-O-Deethylierung und damit CYP 1A1/A2, nicht nennenswert verändert hat.

Ein etwas anderes Bild ergab sich nach *48-stündiger Induktion* mit 3-MC. In diesem Versuch lagen zwischen der Bestrahlung und der Vermessung des Reso 96h im Gegensatz zu 72h vorher. Hierbei wurde, trotz gleicher Durchführung, nur ca. die Hälfte der Proteinmengen des vorangegangenen Versuches ermittelt ( $0,223 \text{ mg/ml}$  vs.  $0,435 \text{ mg/ml}$ ), da sich dadurch auch die Menge Resorufin je ml durchschnittlich halbierte, lagen die Werte für Resorufin/mg Protein im Bereich des ersten Versuches. Was die Verminderung des Proteingehaltes auslöste, konnte nicht geklärt werden. Die Zellen erschienen optisch nicht geschädigt, auch ein herangezogener MTT- Test ließ keine Toxizität erkennen. Die Tendenz, in bestrahlten Zellen mehr Protein gegenüber der Kontrolle zu finden, bestand auch hier, wenngleich nicht so deutlich ausgeprägt wie zuvor (vgl. Abb. 5.3.12).

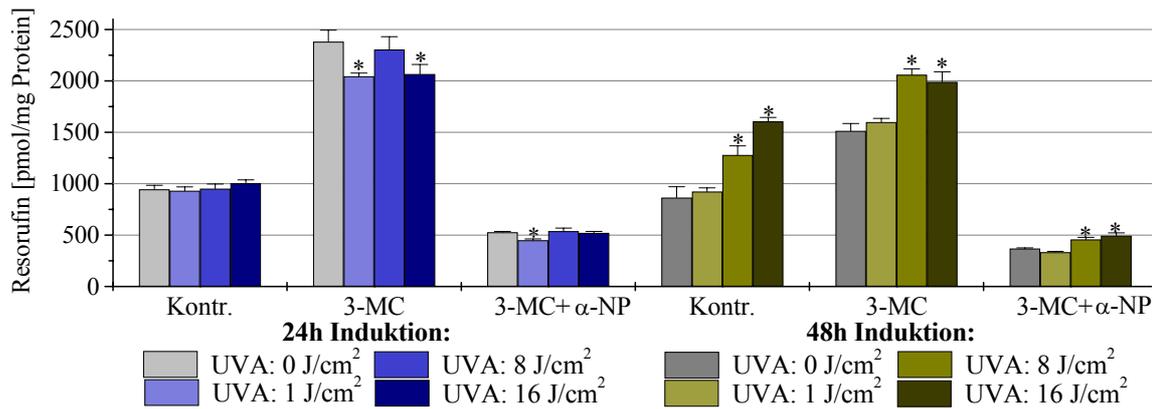


**Abb. 5.3.12:** EROD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC (48h) und anschließender Hemmung per  $\alpha$ - Naphthoflavin

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC ( $2 \mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -NP ( $1 \mu\text{M}$ ), ER ( $2 \mu\text{M}$ ). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 5$  Experimenten dargestellt; \* $p < 0,05$  gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Es zeigte sich eine sehr deutliche Beeinflussung der EROD durch die UVA- Strahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Die Abb. 5.3.13 lässt einen direkten Vergleich zwischen den Induktionszeiten von 24h und 48h zu, dabei entspricht die linke Seite der Abb. 5.3.11 c).

Am auffälligsten war die Abhängigkeit der EROD- Grundaktivität von der UVA- Strahlendosis 96h nach der Bestrahlung. Durch  $16 \text{ J/cm}^2$  UVA wurden Werte im Bereich der 3-MC-induzierten Zellen erreicht. Dagegen blieb die Resorufin- Menge nach 3-MC- Induktion etwas hinter den Werten der 24stündigen Induktion zurück. Aus den induziert und gehemmten Zellen ergaben sich in beiden Fällen ca.  $500 \text{ pmol}$  Resorufin je  $\text{mg}$  Protein.

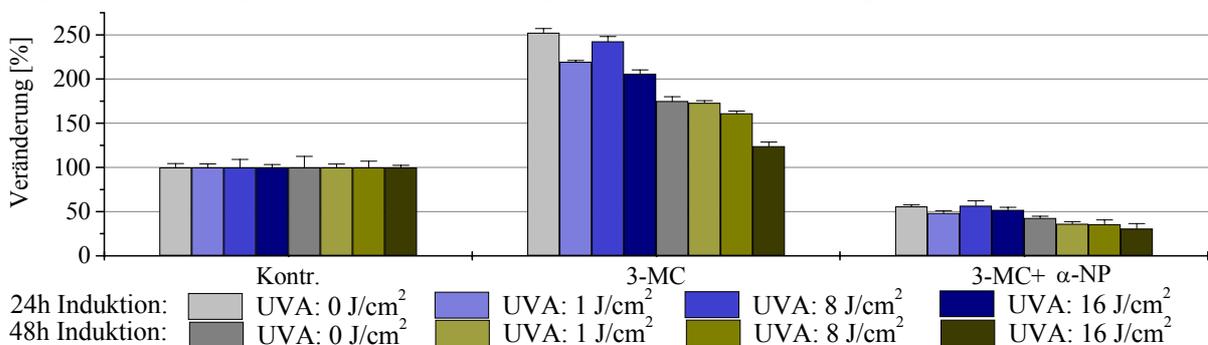


**Abb. 5.3.13:** EROD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per  $\alpha$ - Naphthoflavon - Vergleich von 24stündiger und 48stündiger Induktionszeit-

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Die Vermessung des Resorufin erfolgte 72h bzw. 96h nach der Bestrahlung.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Einen sich daraus ableitenden Aspekt zeigt Abb. 5.3.14. Hier wurden alle Kontrollwerte ohne Induktion und Inhibition gleich 100% gesetzt, um das Ausmaß der Wirkung von UVA in Kombination mit 3-MC und  $\alpha$ -NP darzustellen. Es ergab sich aufgrund der Zunahme des Resorufin- Grundlevels für 3-MC eine nachlassende prozentuale Induktionswirkung mit zunehmender Induktionszeit *und* zunehmender UVA- Bestrahlung, so reichte die Induktionskapazität von 250% (0 J/cm<sup>2</sup> UVA; 24h) bis herab auf 124% (16 J/cm<sup>2</sup> UVA; 48h). Auch die nachfolgende Hemmung mit  $\alpha$ -NP lieferte ein gleiches Profil auf niedrigerem Niveau.



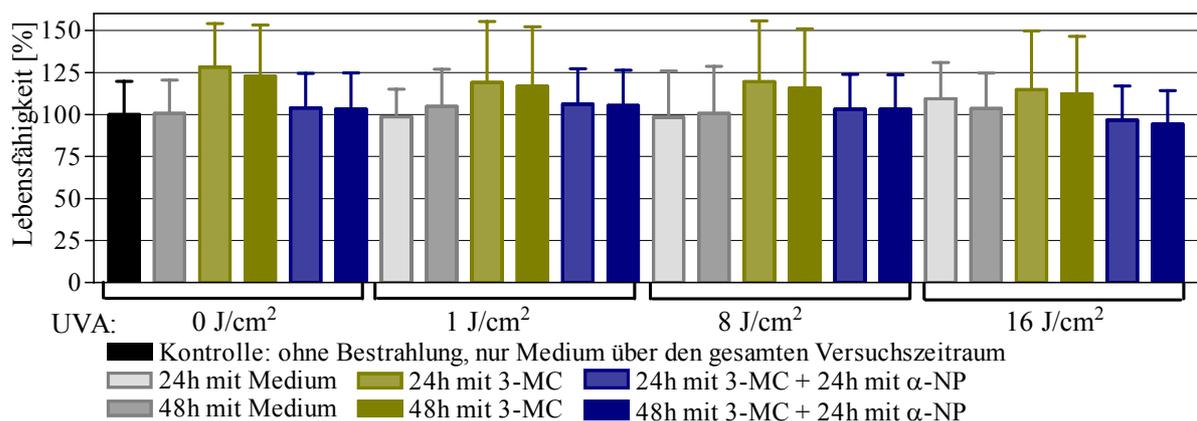
**Abb. 5.3.14:** EROD an HaCaT nach UVA mit nachfolgender Induktion durch 3-MC und anschließender Hemmung per  $\alpha$ - NP; Darstellung der prozentualen Resorufin-Menge (pmol/mg Protein), wenn jeweils die Kontr. ohne Ind. und Inh. = 100%.

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Die Vermessung des Resorufin erfolgte 72h bzw. 96h nach der Bestrahlung.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

### b) MTT nach UVA und EROD

Die Versuche unter Kapitel a) wurden wiederholt und im Anschluss ein MTT- Test durchgeführt (siehe Kap. 4.2.3), um toxische Effekte, die der Betrachtung im Lichtmikroskop verborgen blieben, aufzudecken. Die Abb. 5.3.15 veranschaulicht die dabei ermittelten Werte.



**Abb. 5.3.15:** MTT an HaCaT nach UVA- Bestrahlung, 3-MC-Induktion,  $\alpha$ - NP- Hemmung und EROD

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Die Kontrolle wurde 96h nur mit Medium inkubiert, alle anderen Wells enthielten ER. ER und  $\alpha$ -NP in allen Fällen 24h.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 15 Experimenten dargestellt; die statistische Auswertung mittels einseitiger ANOVA ergab für alle  $p > 0,05$  gegenüber der Kontrolle.

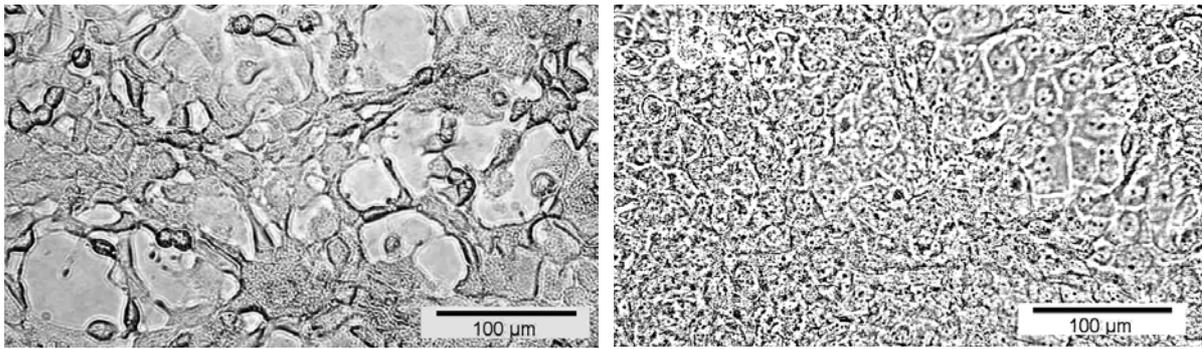
Wenngleich die Standardabweichungen für die MTT- Bestimmung recht hoch ausfielen, wird deutlich, dass in den bisher durchgeführten Versuchen mit UVA- Bestrahlung toxische Effekte keine Rolle spielten. Die etwas höheren Werte für 3-MC, wie auch die, mit fortschreitender Inkubationszeit, tendenziell abnehmende Lebensfähigkeit bestätigen die Daten und Aussagen aus Kapitel 5.2.2.

### 5.3.1.5 Einfluss von UVB- Strahlung

In Abhängigkeit vom zu untersuchenden Effekt des UVB- Lichtes wurden in der Literatur Strahlendosen von 5 bis 300 mJ/cm<sup>2</sup> verwendet [69;70;83;84;106;121;146;181]. Dabei zeigten sich in den geringeren Dosen apoptotische Ereignisse in den Zellen, die mit der Zunahme der UVB- Dosis in nekrotische übergingen. Genaue Grenzen scheint es hierbei nicht zu geben, so wurden nekrotische Effekte an HaCaT's bereits mit Dosen zwischen 20 und 30mJ/cm<sup>2</sup> festgestellt [121], andere Autoren fanden an NHK nach UVB- Bestrahlung mit 50mJ/cm<sup>2</sup> Hinweise für apoptotisch veränderte Zellen. Hier traten nekrotische Ereignisse erst bei einer extrem hohen UVB- Dosis von 300mJ/cm<sup>2</sup> auf [69].

Wie unter Kap. 4.3.1.3 d) angesprochen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von 25; 50 und 100mJ/cm<sup>2</sup> UVB- Strahlung auf das fremdstoffmetabolische Verhalten von HaCaT- Zellen untersucht werden. Der Einsatz von 100mJ/cm<sup>2</sup> erwies sich sehr schnell als nicht praktikabel - 24h nach der Bestrahlung, bei der Entfernung der Medien, zeigte sich, dass alle Zellen vom Gefäßboden abgelöst waren. Untersuchungen ergaben, dass die Ablösung der Zellen, deren Tod bedingte. Wenngleich in der Literatur keine DNA- Fragmente für abgelöste Zellen gefunden wurde, ergaben sich im Elektronenmikroskop geschrumpfte Zellen mit verdichtetem Zellkern (Fotos in [69]). Die nachfolgende Abb. 5.3.16 zeigt eigene, lichtmikroskopische Aufnahmen von HaCaT- Zellen nach 100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und die Kontrolle ohne Bestrahlung.

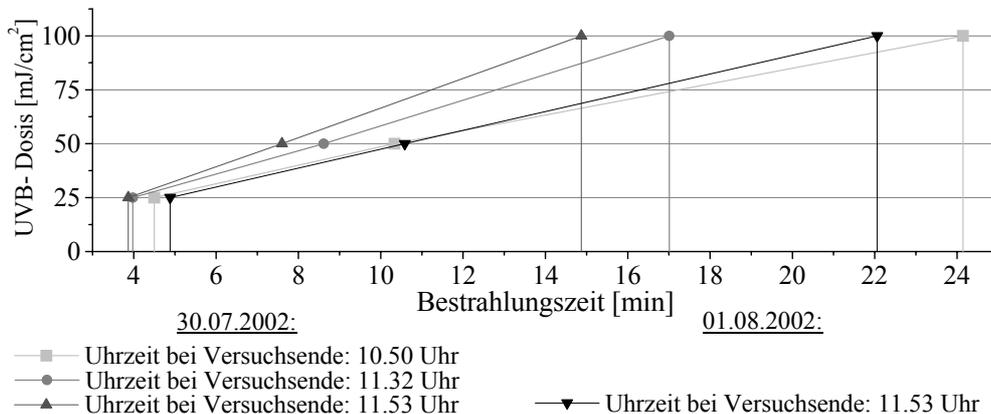
Somit wurden alle weiteren Versuche auf 25 und 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB begrenzt.



**Abb. 5.3.16:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines HaCaT- Monolayers 24h nach UVB- Bestrahlung; links:  $100 \text{ mJ/cm}^2$ ; rechts: unbestrahlte Kontrolle

#### a) Vergleich von natürlichem mit künstlichem UVB- Licht

Die Beziehung zwischen UVB-Strahlendosis in den Versuchen und der natürlichen Strahlung wurde entsprechend Kapitel 4.5.2.1 selbst ermittelt, da für Bestrahlungen mit der eingesetzten Kammer dies in der Literatur bisher nicht beschrieben war.



**Abb. 5.3.17:** Auftreffen ausgewählter UVB- Dosen auf der Erde

Bestimmung an einem sonnigen, wolkenlosen Sommertag (30.07.02) und an einem Sommertag mit heiterem Himmel (01.08.02, nur vereinzelte Wolken)

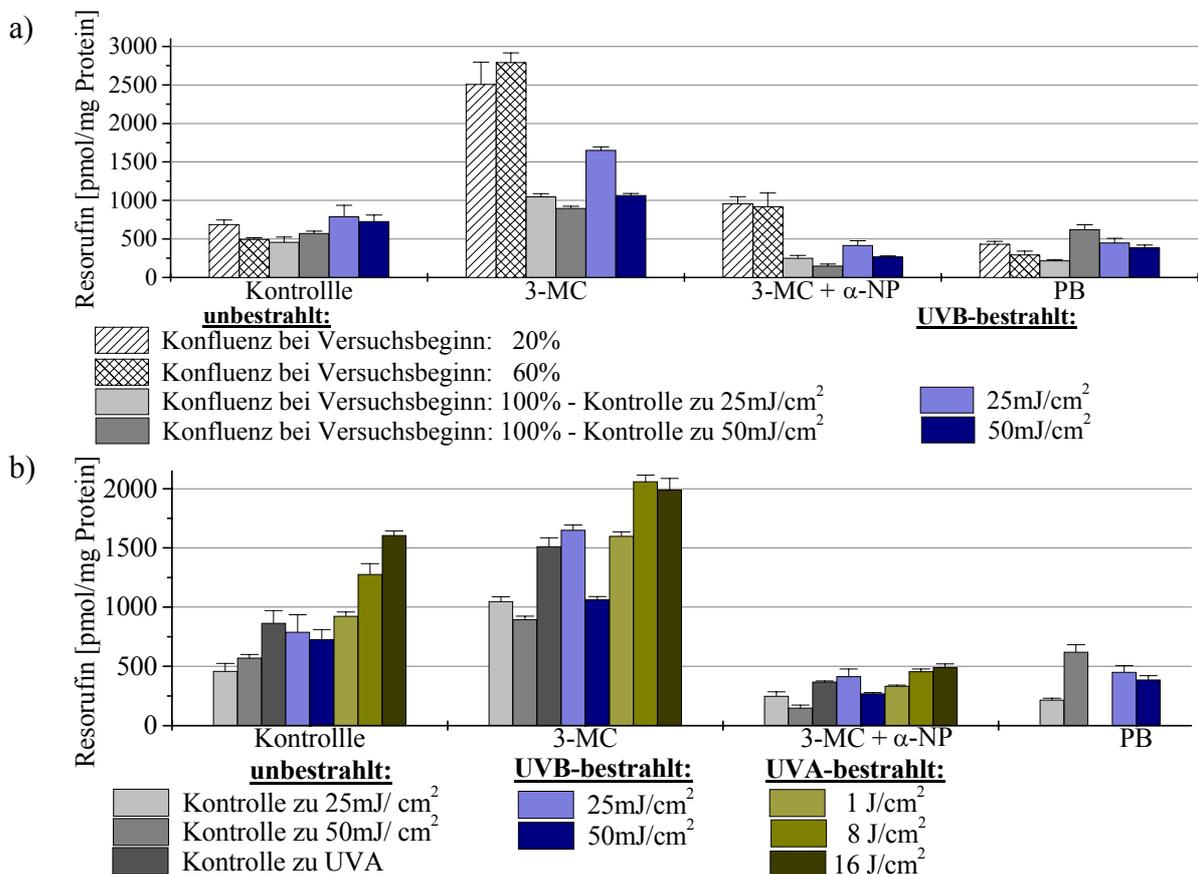
Aus Abb. 5.3.17 ist gut zu erkennen, dass UVB-Dosen von  $25 \text{ mJ/cm}^2$  in 4-5 min auf der Erde auftrafen. Je nach Uhrzeit und Bewölkung dauerte es 7-11 min ehe  $50 \text{ mJ/cm}^2$  erreicht waren, und um  $100 \text{ mJ/cm}^2$  zu messen, vergingen knapp 15 bis 24 min. Verglichen mit UVA, war für UVB die Zeit in der Bestrahlungskammer zur Erreichung der angegebenen Strahlendosen wesentlich geringer. Es dauerte 0,5 min, 1 min und 2 min, um die Proben mit  $25$ ,  $50$  und  $100 \text{ mJ/cm}^2$  zu bestrahlen. D.h. in ca. einem Zehntel der Zeit gegenüber der Natur traf die gleiche UVB- Strahlung auf die HaCaT- Zellen. Es ist anzunehmen, dass dies ein weiterer Grund für die beobachtete Schädigung der Zellen nach UVB ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) neben der generell starken Toxizität hoher UVB- Dosen ist. Als Ursache der ausgeprägten Zellschädigung könnte auch der vergleichsweise geringe Abstand des Zellmaterials von den UV- Röhren in Betracht kommen (18 cm). In anderen Arbeitsgruppen reichte dieser von 20 cm für HaCaT- Bestrahlungen [95;207] bis zu 35 cm für NHK [69] bzw. HaCaT [177].

### b) EROD nach UVB- Bestrahlung

Der Versuchsablauf entsprach dem unter Kap. 4.3.1.3 d) Beschriebenen. HaCaT- Zellen, die zuvor mit UVB- Licht bestrahlt wurden, sollten mittels EROD auf Veränderungen in ihrem metabolischen Verhalten der Cytochrom- Enzyme 1A1/A2 untersucht werden.

Diese Versuche wurden zu einem früheren Zeitpunkt als die UVA- Bestrahlungen durchgeführt. Aus diesem Grund finden sich hier in allen Experimenten neben Untersuchungen mit 3-MC- Induktion (2 $\mu$ M) auch solche mit PB- Induktion (1mM), beides über 24h oder 48h. Als Inhibitor kam in allen Fällen  $\alpha$ - NP (1 $\mu$ M) für 24h zum Einsatz. Die Zeit mit dem Substrat ER (2 $\mu$ M) betrug ebenfalls immer 24h.

Zunächst wurde das Verhalten zwischen UVB- bestrahlten Zellen und den unbestrahlten Kontrollen untersucht (Abb. 5.3.18 a) und in der Folge diese Ergebnisse mit den Werten aus Abb. 5.3.13 nach UVA- Bestrahlung verglichen (Abb. 5.3.18 b). Die Induktionszeit betrug für diese Untersuchung einheitlich 48h.



**Abb. 5.3.18:** EROD an HaCaT nach UV- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion (48h) durch 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per  $\alpha$ - NP

a) Dargestellt sind die Resorufin- Werte für UVB- Bestrahlung mit 25 bzw. 50mJ/cm<sup>2</sup>. Da es sich um zwei unabhängige Versuche handelt, sind dazu die jeweiligen unbestrahlten Kontrollen mit angegeben. Zum Vergleich wurden die Werte zweier unbestrahlter Versuche in die Darstellung aufgenommen, deren Zellen bei Induktorkzugabe noch keine Konfluenz erreicht hatten.

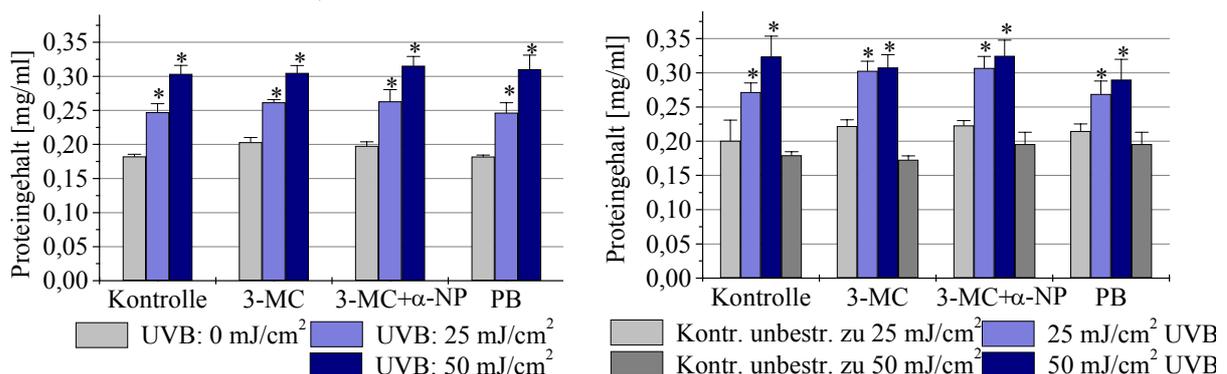
b) Dargestellt sind die Resorufin- Werte für UVB- im Vergleich zu UVA- Bestrahlung und ohne Bestrahlung. Für UVB wurde mit HaCaT- Zellen der Passagen 35 und 36 gearbeitet, für UVA kam P38/39 zum Einsatz. Bei allen Versuchen betrug die Zeit mit  $\alpha$ - NP und ER jeweils 24h. Die Vermessung des Resorufin erfolgte somit 96h nach der Bestrahlung. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM),  $\alpha$ - NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Es sind in allen Fällen die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

Die ermittelten Resorufin- Werte lagen nach 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB immer signifikant über der mitgeführten unbestrahlten Kontrolle, ganz gleich, ob nur mit Medium inkubiert; induziert oder induziert + inhibiert wurde (statistische Auswertung nicht dargestellt). Für 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB galt weitgehend das gleiche, lediglich die Werte mit PB- Behandlung lagen nach der Bestrahlung signifikant unter den entsprechend uninduzierten Kontrollwerten.

Da in den Bestrahlungsversuchen immer mit konfluenten Zellen gearbeitet wurde, sollte an der Stelle ein Vergleich der unbestrahlten Kontrollen zu ansonst gleich behandelten, unkonfluenten Zellen gezogen werden (Abb. 5.3.18 a). Im Ergebnis fanden sich für 3-MC- induzierten Zellen im Mittel 2,7-fach höhere Reso- Werte in den unkonfluenten HaCaT- Zellen. Wurden die Zellen nach der 3-MC-Induktion mit  $\alpha$ -NP gehemmt, lieferten die unkonfluenten Zellen 4,7-fache höhere Resorufin- Werte. Im Grundlevel (=Kontrolle) und den PB- behandelten Zellen zeigten sich diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede.

Der Vergleich der Grundaktivitäten von UVA- und UVB- bestrahlten HaCaT- Zellen (Abb. 5.3.18 b), verdeutlicht die mit steigender UVA- Strahlendosis zunehmende EROD- Aktivität. Die Resorufin- Mengen UVB- bestrahlter Zellen übertrafen ihre mitgeführten unbestrahlten Kontrollen, sie erreichten Reso- Werte im Bereich derer nach UVA 0 J/cm<sup>2</sup> und 1 J/cm<sup>2</sup>. Ein vergleichbares Bild fand sich für die 3-MC- induzierten Zellen, einzige Ausnahme – die Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> lieferte geringere Reso- Mengen im Bereich der unbestrahlten Kontrollen, ebenso fiel dieser Wert mit nachfolgender  $\alpha$ -NP-Hemmung sehr niedrig aus. Allgemein wurden durch  $\alpha$ -NP-Behandlung in allen Fällen die Reso- Werte unter das Kontrollniveau herabgesetzt. Phenobarbital induzierte die EROD nicht, ganz gleich nach welcher UV- Bestrahlung. Die Reso- Mengen hier waren vergleichbar mit der uninduzierten Kontrolle.

Auch in Versuchen mit UVB konnte in den bestrahlten Proben nach 96h signifikant mehr Protein gegenüber der entsprechenden unbestrahlten Kontrolle nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.3.12 b mit Abb. 5.3.19).



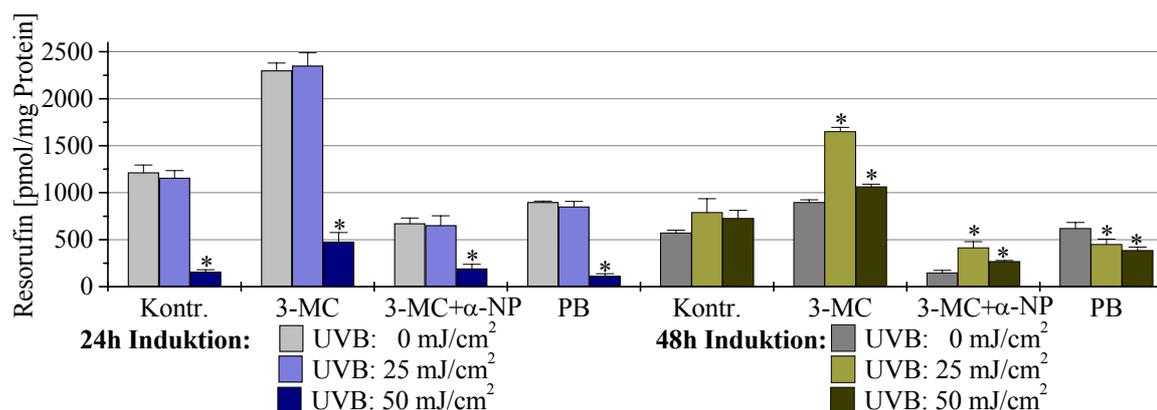
**Abb. 5.3.19:** Proteingehalt zu: EROD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung, Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per  $\alpha$ - NP

a) 24h Induktion = 72h nach der Bestrahlung    b) 48h Induktion = 96h nach der Bestrahlung  
Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA.

Es fällt auf, dass, unabhängig ob Induktion, Inhibition oder nur Medium, der Proteingehalt gleich bestrahlter Gruppen immer annähernd konstant war. Das bedeutet, die Induktion durch

3-MC mündete nicht in einer Erhöhung des Proteingehaltes. Unterschiede in der Darstellung von Reso/ml und Reso/mg Protein, wie sie für UVA in Abb. 5.3.11 a und c gezeigt wurden, traten hier nicht auf.

Bereits zu Beginn des Kapitels angesprochen, wurde nicht nur der Einfluss verschiedener Strahlendosen, sondern auch die Auswirkung zweier Induktionszeiten auf das metabolische Verhalten der HaCaT- Zellen nach UVB- Bestrahlung untersucht. In den obigen Versuchen betrug die Induktionszeit mit 3-MC oder PB einheitlich 48h. Die nächste Abbildung zeigt den Bezug dieser Werte zur 24stündigen Induktion, es blieben alle anderen Parameter unverändert. Die Abbildungen 5.3.20 und 5.3.13 lassen einen direkten Vergleich zwischen UVB und UVA- bestrahlten HaCaT- Zellen zu.



**Abb. 5.3.20:** EROD an HaCaT nach UVB- Strahlung mit nachfolgender Induktion per 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per α- NP - Vergleich von 24-stündiger mit 48stündiger Induktionszeit

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2μM), PB (1mM), α-NP (1μM), ER (2μM). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Die Vermessung des Resorufin erfolgte 72h bzw. 96h nach UVB.

Es sind die Mittelwerte ± SD von n = 5 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Resorufin- Mengen nach UVB- Bestrahlung wichen z.T. sehr stark von denen nach UVA- Bestrahlung ab. Besonders fällt auf, dass alle Werte nach 24h Induktion und 50 mJ/cm<sup>2</sup> weit unter denen der unbestrahlten Kontrollen und den mit 25 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Proben lagen. So entsprach der Wert 500 pmol Reso/mg Protein nach 3-MC-Induktion annähernd den Reso- Mengen mit nachfolgender α-NP-Hemmung aus den UVA- Versuchen. Dagegen lagen die Reso- Werte nach 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und 24h Induktion für alle 4 Gruppen im Bereich der unbestrahlten Kontrollen und waren außerdem vergleichbar mit den Daten aus der UVA- Bestrahlung.

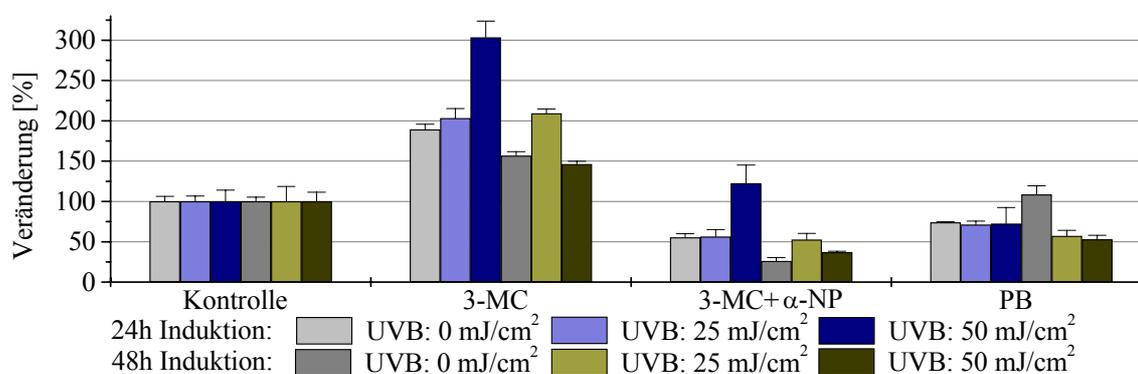
Nach 48h Induktion und somit 96h nach der Bestrahlung zeigte sich ein anderes Bild. Ergaben sich für 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB generell Resorufin- Mengen, die in allen Gruppen niedriger als nach der 24stündigen Induktion lagen, so waren für 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB diese Werte durchweg höher, verglichen mit 24h Induktion.

Wie schon zuvor erwähnt, führte UVB (25 mJ/cm<sup>2</sup>) nach 48-stündiger Induktion zu signifikant erhöhten Resorufin- Mengen (einzige Ausnahme: 48h PB) in Bezug auf die unbestrahlten Kontrollen, noch bei 24h unterschieden sich diese Werte kaum von der Kontrolle. Es muss an dieser Stelle auch festgestellt werden, dass die Mediumkontrollwerte aller Gruppen 96h

nach der Bestrahlung niedriger als 72h nach der Strahlung lagen. Mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und 24h Induktion kam es zu extrem geringeren Reso- Werten, für 3-MC betrug die Resorufin-Menge nur noch rund 20% gegenüber unbestrahlten und 25 mJ/cm<sup>2</sup>-bestrahlten HaCaT- Zellen. Nach 48h Induktion waren die Werte für 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB zwar deutlich höher, konnten aber die Werte nach der 25 mJ/cm<sup>2</sup>-UVB-Bestrahlung nicht erreichen.

Der Vergleich der Proteinmengen 72h und 96h nach der Bestrahlung lieferte ein vergleichbares Bild zu allen bisherigen Versuchen (Abb. 5.3.19 a und b).

Analog zu Abb. 5.3.14 ist die Abb. 5.3.21 aufgebaut. Sie gibt die EROD- Werte nach UVB an, wenn die Medium- Kontrollen 100% gesetzt wurden. Im Gegensatz zur UVA- Strahlung ließen sich für UVB- bestrahlte HaCaT- Zellen hinsichtlich der prozentualen Resorufin-Mengen keine grundsätzlichen Tendenzen in Bezug auf Strahlendosis und Induktionszeit ableiten. Es ist zu erkennen, dass, ganz gleich nach welcher Zeit, die prozentuale Veränderung von 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB- bestrahlten Zellen in den einzelnen Gruppen konstant war und sich kaum von der unbestrahlten Kontrolle unterschied.



**Abb. 5.3.21:** EROD an HaCaT nach UVB mit nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB und Hemmung per  $\alpha$ -NP; Darstellung der prozentualen Resorufin-Menge (pmol/mg Protein), wenn die Kontrolle ohne Ind. und Inh. = 100%

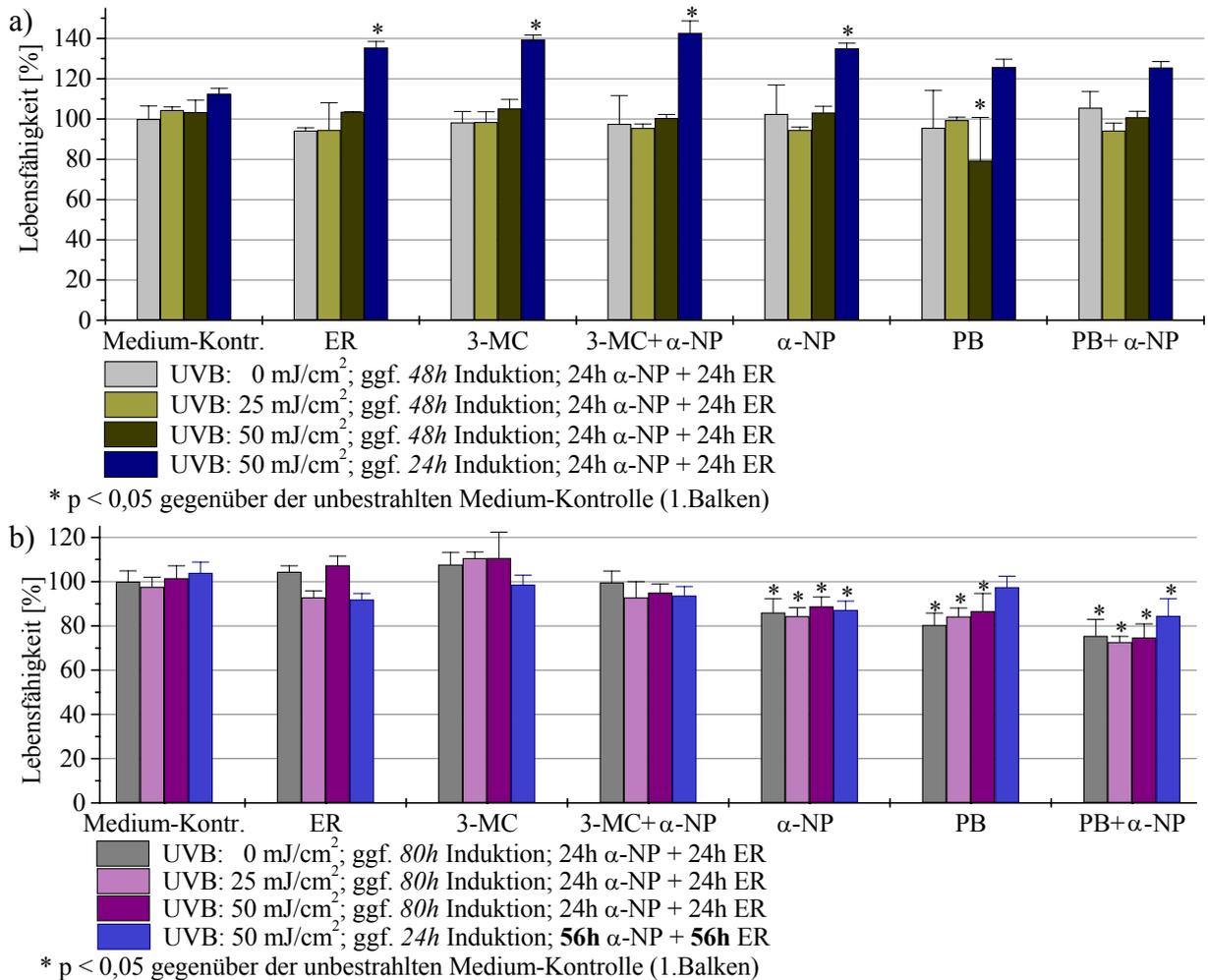
Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM)  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). Inhibition und ER in allen Fällen 24h. Die Vermessung des Resorufin erfolgte 72h bzw. 96h nach der Bestrahlung. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

Ein Vergleich der Resorufin-Mengen zwischen UVA- und UVB- behandelten Zellen hinsichtlich der einzelnen Strahlendosen ergab, dass die Werte nach 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB im Bereich von denen nach 1 J/cm<sup>2</sup> UVA lagen, sowohl 72h als auch 96h nach den Bestrahlungen.

### c) MTT nach UVB und EROD

Da im Lichtmikroskop bereits 24h nach Bestrahlung mit UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) die HaCaT- Zellen deutliche Schädigungen, wie Schrumpfung und zunehmende Vakuolisierung aufwiesen, sollten die Auswirkungen der Strahlung in Kombination mit den Induktoren,  $\alpha$ -NP und dem Substrat ER getestet werden. Dazu wurden die mit UVB-Bestrahlung durchgeführten Versuche unter analogen Bedingungen wiederholt, um der Resorufin- Vermessung einen MTT-Test anzuschließen (siehe auch Kap. 4.2.3). Die hier aufgeführten Kontrollen wurden ausschließlich mit Medium behandelt. Neben den Kombinationen Induktor + Inhibitor + ER wurde zusätzlich die alleinige Toxizität von ER bzw.  $\alpha$ -NP + ER nach UV- Bestrahlung untersucht. Es wurde ein zweiter Versuch mit längeren Induktionszeiten (80h) oder längerer Inhibi-

tion (56h) + ER- Zeit (56h) unternommen, um vertiefende Aussagen zur Toxizität machen zu können. Alle Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.3.22 a und b) dargestellt.



**Abb. 5.3.22:** MTT an HaCaT nach UVB- Bestrahlung, nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per α- NP und anschließender EROD

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2μM), PB (1mM), α-NP (1μM), ER (2μM). 24h nach der Bestrahlung wurden die Induktoren für den entsprechenden Zeitraum zugegeben, die anderen Gruppen verblieben in dieser Zeit mit Medium. Nach entfernen aller Lösungen erhielt die Kontrollgruppe wieder Medium, die 2., 3. und 6. Gruppe nur ER; allen anderen Wells wurde α- NP + ER zugesetzt. Es ergaben sich daraus insgesamt folgende Versuchszeiten nach Bestrahlung:

72h    ■    104h    ■  
 96h    ■    128h    ■

Es sind die Mittelwerte ± SD von n = 12 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Es fällt auf, dass die Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen aus dem 72-stündigen Versuch alles andere übertraf, ganz gleich, womit inkubiert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Zeit nach der Bestrahlung und damit die gesamte Versuchsdauer erheblichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Bei den Bestrahlungsversuchen wurde dies besonders deutlich, da bei Versuchsbeginn bereits ein konfluent Monolayer vorlag, wodurch die Kontakthemmung die weitere Zellteilung einschränkte, so dass die induktiven Effekte, insbesondere des 3-MC, kaum zum tragen kamen. Somit wurden toxische Erscheinungen nicht durch Zellzuwachs überdeckt.

Eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit konnte für α-NP, PB und PB + α-NP in den 128

Stunden währenden Versuchen nachgewiesen werden (alles in Kombination mit ER). Für PB deutete sich diese Toxizität bereits in den vorangegangenen MTT- Tests an (vgl. Tab. 5.2.2), wenngleich in diesen Fällen nur PB bis 72h untersucht wurde. Für  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) allein fanden sich bisher keine schädlichen Wirkungen auf HaCaT- Zellen. Allerdings endeten vorangegangene Testungen nach 90h und schlossen auch nicht die Kombination mit ER ein.

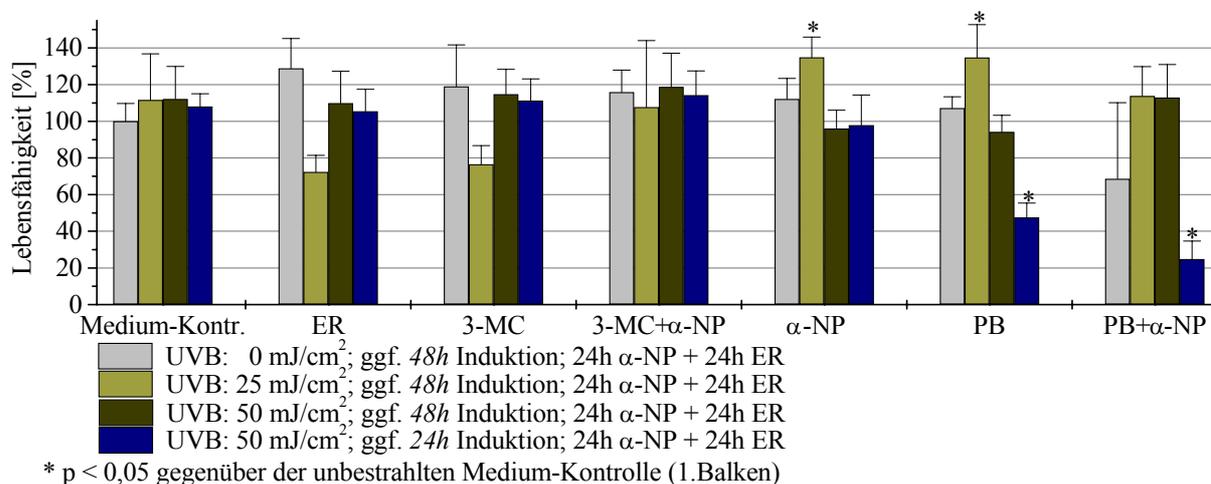
Die längere Zeit (56h) mit ER und  $\alpha$ -NP beeinflusste die Zellen gegenüber der sonstigen Inkubationszeit von 24h nicht negativ.

Die vermutete Toxizität nach 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB konnte hingegen weder gegenüber den unbestrahlten Kontrollen noch gegenüber 25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB belegt werden, lediglich nach 48h PB zeigten sich breite Schwankungen in der Lebensfähigkeit, die sich in einer entsprechenden Standardabweichung nieder schlugen.

Somit lässt sich insgesamt feststellen, dass die im Lichtmikroskop beobachteten Beeinträchtigungen der HaCaT- Zellen nach 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB nicht in einer erhöhten mitochondrialen Toxizität mündeten.

#### d) Neutralrot nach UVB und EROD

Da der MTT- Test keine Anhaltspunkte für eine Zellschädigung nach 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB lieferte, wurde für diese Versuche der Neutralrot (NR)-Test herangezogen, um eventuelle membrantoxische Effekte durch die UVB-Bestrahlung aufzudecken. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Es wurden zunächst, wie in allen Versuchen zuvor, die Bestrahlung, die Induktion, die Inhibition und die Umsetzung mit ER durchgeführt, im Anschluss daran folgte der NR- Test.



**Abb. 5.3.23:** NR an HaCaT nach UVB- Bestrahlung, nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per  $\alpha$ - NP und anschließender EROD

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), PB (1mM),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), ER (2 $\mu$ M). 24h nach der Bestrahlung wurden die Induktoren für den entsprechenden Zeitraum zugegeben, die anderen Gruppen verblieben in dieser Zeit mit Medium. Nach entfernen aller Lösungen erhielt die Kontrollgruppe wieder Medium, die 2., 3. und 6. Gruppe nur ER; allen anderen Wells wurde  $\alpha$ - NP + ER zugesetzt. Es ergaben sich daraus insgesamt Versuchszeiten nach Bestrahlung von 72h und 96h.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 12 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Im Vergleich zum analogen Versuch der Toxizitätsermittlung per MTT (Abb. 5.3.22 a), lieferte der NR-Test andere Ergebnisse. Zunächst ist zu sehen, dass es für die kürzere Induk-

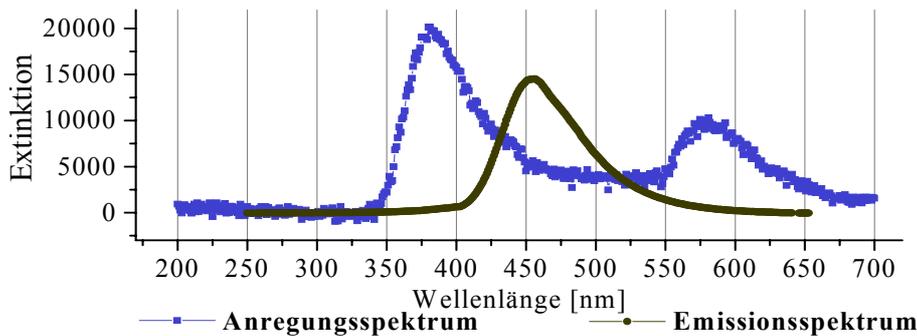
tionszeit keinen Vorteil bezüglich der Lebensfähigkeit gab. Im Gegenteil, hier zeigte sich die zytotoxische Wirkung von PB und PB +  $\alpha$ -NP in Kombination mit ER besonders deutlich. Der Abfall der Lebensfähigkeit für ER und 3-MC nach UVB ( $25 \text{ mJ/cm}^2$ ) kann eine mögliche Erklärung für die geringeren Reso- Mengen nach 48stündiger Induktion in der Abb. 5.3.20 (rechte Seite) gegenüber der linken Seite mit der gleichen Bestrahlung und nur 24stündiger Induktion sein.

Außer den eben erwähnten Auffälligkeiten ließ sich auch durch den NR- Test keine generell höhere Toxizität durch Bestrahlung mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB gegenüber den Kontrollen oder den mit  $25 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlten HaCaT- Zellen nachweisen.

Damit führten die im Mikroskop beobachteten Zellschädigungen nach  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB offensichtlich nicht zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität und auch nicht zur Schädigung der Zellmembranen. Möglicherweise sind diese Schäden der Zellen der Grund für die sehr geringen Reso- Werte nach  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB und 24stündiger Induktion bzw. 72stündiger Versuchsdauer. Aufgrund längerer Induktions- und damit Versuchszeiten war es den Zellen scheinbar möglich, diese Schäden entweder zu reparieren oder durch Zellzuwachs auszugleichen, so dass nach 96stündiger Versuchsdauer die Reso- Mengen merklich höher lagen (vgl. Abb. 5.3.20).

### 5.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

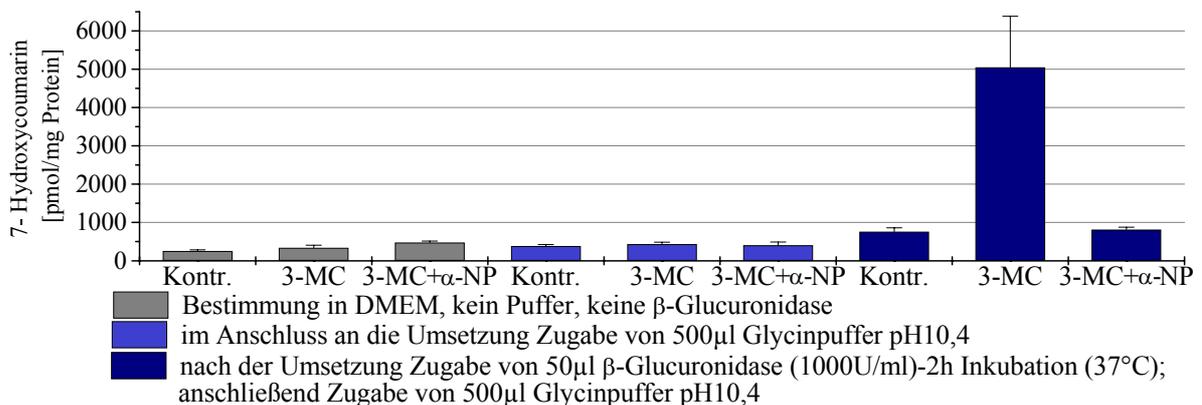
Zunächst wurde für das entstehende Produkt 7-Hydroxycoumarin (7-HC) mit Hilfe eines Fluoreszenz- Spektrophotometers ein Absorptions-/ Emissionsspektrum aufgezeichnet (7-HC 1  $\mu$ M in Medium B<sub>alk</sub>). Dabei lag das Extinktionsmaximum des Anregungsspektrums bei 381 nm, das des Emissionsspektrums bei 456 nm. Die Abb. 5.3.24 gibt diese Spektren wieder. Dementsprechend konnte in der Folge mit dem Excitationsfilter 390 nm und dem Emissionsfilter 460 nm gearbeitet werden.



**Abb. 5.3.24:** Spektren von 7-Hydroxycoumarin (1  $\mu$ M) nach Vermessung in DMEM-Medium B<sub>alk</sub>

#### 5.3.2.1 Bestimmung der Grundaktivität, der Induzierbarkeit und Inhibition

Es klang bereits unter Material und Methoden (Kap. 4.3.2.3 a) an, dass die Bestimmung von 7-HC im Medium ohne weitere Zusätze nicht gelang. In der folgenden Abb. 5.3.25 sind drei Abwandlungen der Durchführung dargestellt. Der Einfachheit halber erfolgt im Weiteren die Bezeichnung  $\beta$ -Glucuronidase bzw.  $\beta$ -Gluc., es handelte sich aber immer um eine Mischung aus  $\beta$ -Glucuronidase mit Sulfatase (siehe Kap. 4.9).



**Abb. 5.3.25:** ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavon unter verschiedenen Assay-Bedingungen

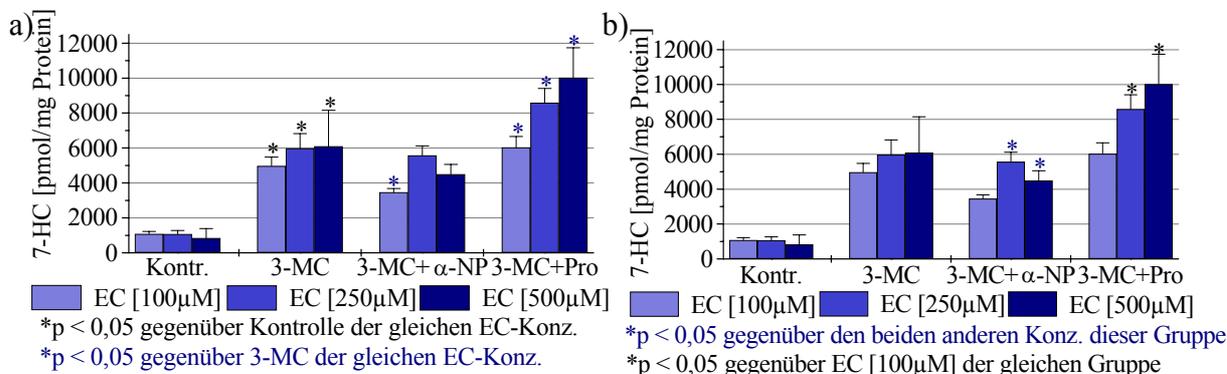
Konfluenz zu Versuchsbeginn 80%. Endkonzentrationen: 3-MC (2  $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (1  $\mu$ M), EC (125  $\mu$ M). Die Induktionszeit mit 3-MC betrug 24h, die Zeit mit  $\alpha$ -NP und EC lag in allen Fällen bei 48h. Es wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentrationen EC für alle Behandlungen gleich war. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

Aus der vorstehenden Abbildung ist ersichtlich, dass die alleinige Umsetzung von EC in Medium zu konstanten 7-HC-Werten um 400 pmol/mg Protein führte, unabhängig, ob die Zellen zuvor induziert, oder nachfolgend gehemmt wurden. Das gleiche Bild ergab sich, als nach der

Deethylierung der pH-Wert des Mediums erhöht wurde. Erst der Einsatz von  $\beta$ -Glucuronidase erbrachte eine drastische Veränderung in den 7-HC- Mengen. Nun wurde eine Grundaktivität der 7-Ethoxycoumarindeethylase von ca. 760 pmol 7-HC/mg Protein nach Einsatz von 7-EC (125 $\mu$ M) über 48h bestimmt. Der Wert nach 24stündiger Induktion mit 3-MC stieg gegenüber dem Basislevel um das 6,6-fache auf ca. 5050 pmol HC/mg Protein. Eine Hemmung dieser Induktion gelang mit  $\alpha$ -NP, so dass nach 48h der 7-HC-Wert wieder annähernd das Basisniveau erreichte, allerdings waren diese Zellen, mikroskopisch betrachtet, deutlich geschädigt. Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen konnte in allen weiteren Versuchen das freie 7-HC erst nach der Deglucuronidierung/-sulfatierung bestimmt werden, da das aus 7-EC gebildete, freie 7-HC sofort durch Phase-II-Reaktionen weiter umgesetzt wurde. Eine Untersuchung, in welchem Verhältnis Glucuronide und Sulfate zueinander stehen, erfolgte nicht. Es wurde nicht geprüft, ob neben diesen beiden Reaktionen noch andere Phase-II-Reaktionen, wie z.B. Glutathionkonjugation, Acetylierung und andere zum tragen kamen. Die im Weiteren vorgestellten Ergebnisse sind somit als Menge an freiem 7-Hydroxycoumarin, erhalten nach Deglucuronidierung und Desulfatierung, zu verstehen. Aufgrund der Möglichkeit, weitere Phase-II-Konjugate zu bilden, könnte die Umsatzrate etwas höher liegen. Eine sehr deutliche Veränderung der Ergebnisse ist allerdings auszuschließen, da es sich bei der Deglucuronidierung und der Desulfatierung um die beiden für OH-Gruppen am bedeutendsten Phase-II-Reaktionen handelt [23]. Alle folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die in Kap. 4.3.2.3 a) angegebenen Versuchsbedingungen, d.h. die Zeit mit dem Substrat 7-EC und den verschiedenen Inhibitoren betrug immer 24h.

Als INDUKTOR fand zunächst nur 3- *Methylcholanthren* (3-MC) in 2 $\mu$ M-er Konzentration Verwendung. Zur INHIBITION kamen  $\alpha$ - *Naphthoflavin* ( $\alpha$ -NP) -0,5 $\mu$ M- und *Proadifen* (Pro) -50 $\mu$ M- zum Einsatz. In den Toxizitätstests (Kap. 5.2) erwiesen sich diese Kombinationen, wie auch die einzelnen Substanzen, als akzeptabel in ihrer Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen über einen Zeitraum von 48h. Eine angenommene Produktmenge von bis zu 100 $\mu$ M 7-HC erbrachte, ebenfalls über 48h, keinerlei Toxizität gegenüber den Zellen. Die nachfolgende Abb. 5.3.26 zeigt das Basislevel (bezeichnet als Kontr.) der ECOD für drei verschiedene Konzentrationen 7-EC, sowie die Induktionskapazität des Enzyms nach 3-MC- Behandlung und die Auswirkungen des Einsatzes der Inhibitoren  $\alpha$ -NP bzw. Proadifen. Die Abb. 5.3.26 macht deutlich, dass die Menge an gebildetem 7-Hydroxycoumarin im Basislevel nicht mit steigender 7-EC-Konzentration zunimmt, im Gegenteil sie nimmt, zwar nicht signifikant, aber tendenziell ab. Diese Abnahme ist vermutlich auf die steigende Toxizität des Substrates zurückzuführen (vgl. Abb. 5.2.19). Die Induktion mit 3-MC ergab für alle 7-EC-Konzentrationen signifikant über dem Basisniveau liegende 7-HC- Werte. Der Einsatz des Inhibitors  $\alpha$ -NP konnte in Kombination mit 7-EC nur in 0,5 $\mu$ M-er Endkonzentration erfolgen, und nicht, wie oben und in den EROD- Untersuchungen, mit 1 $\mu$ M. Der Grund war wiederum die zu starke Toxizität. Die geringere Konzentration von  $\alpha$ -NP ist eine mögliche Ursache, dass die Menge an 7-HC nach 3-MC- Induktion durch diesen Inhibitor nicht wieder auf den Basislevel abgesenkt werden konnte. Lediglich mit EC (100 $\mu$ M) und  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) war eine

signifikante Reduktion der 7-HC-Werte gegenüber der reinen Induktion zu beobachten. Die Kombination 7-EC (250 $\mu$ M) +  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) vermochte die Produkt- Menge gegenüber der vorherigen 3-MC-Induktion nicht zu reduzieren. Die größte untersuchte Substrat- Konzentration von 500 $\mu$ M ergab mit  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) eine nicht signifikante Verminderung der 7-HC-Menge.



**Abb. 5.3.26:** ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin oder Proadifen

Bei den Abbildungen handelt es sich um das gleiche Diagramm. Die doppelte Darstellung dient der Erläuterung unterschiedlicher statistischer Aspekte. Konfluenz zu Versuchsbeginn 80%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M), Proadifen (50 $\mu$ M). Die Induktionszeit mit 3-MC betrug 24h, die Zeit mit den Inhibitoren und EC lag in allen Fällen bei 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

In Abb. a) wurde der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben angewandt. Es wurde verglichen: 3-MC gegen Kontrolle (\*); 3-MC +  $\alpha$ -NP gegen 3-MC (\*) sowie 3-MC + Proadifen gegen 3-MC (\*) jeweils für die gleiche EC-Konzentration. In Abb. b) erfolgte die statistische Auswertung per einseitiger ANOVA und Bonferroni's multiplem Vergleichstest. Es wurden für jede Gruppe die verschiedenen EC- Konzentrationen verglichen.

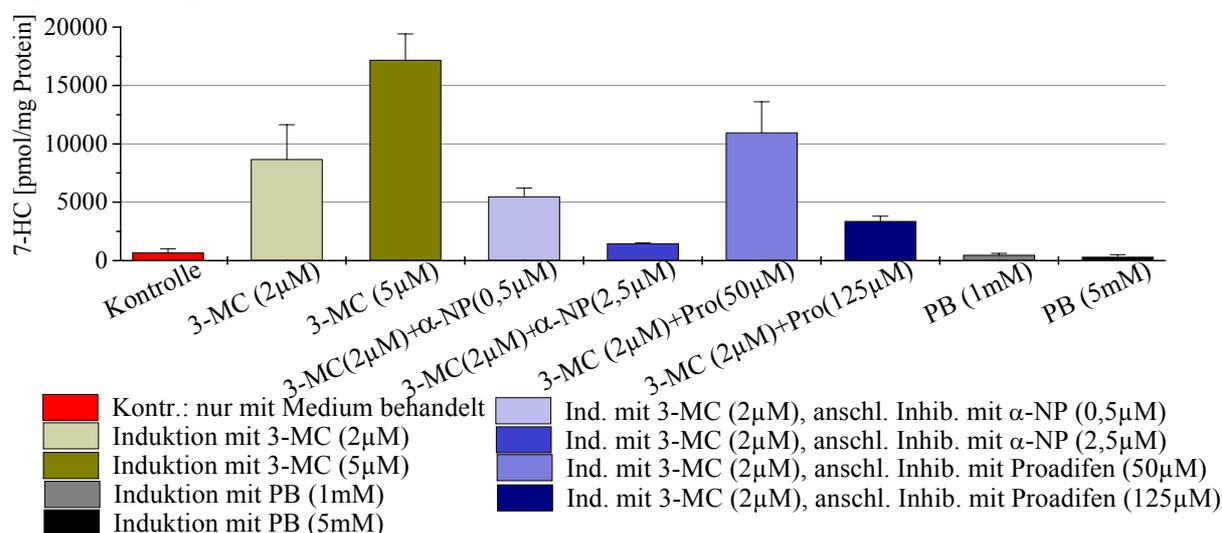
Drastischer fielen die Ergebnisse für die Verwendung von Proadifen als Inhibitor aus. In allen drei Kombinationen aus 7-EC und Proadifen lagen die 7-HC-Werte signifikant über denen der reinen 3-MC- Induktion. Dies lässt die Vermutung zu, das Proadifen in der Konzentration von 50 $\mu$ M eine eher induzierende als inhibierende Auswirkung auf die Ethoxycoumarin- Deethylierung hat.

Obwohl eine größere 7-EC- Konzentration teilweise zu vermehrter Produktbildung führte (Abb. 5.3.26 2. Spalte: 3-MC und 4. Spalte: 3-MC + Proadifen), sind die Verhältnisse nicht linear. Für 3-MC heißt das, die Konz. 7-EC (250 $\mu$ M) führte nicht zu einer 2,5-fachen Erhöhung an 7-HC, gegenüber 7-EC (100 $\mu$ M), sondern nur zur 1,2fachen Steigerung. Für 500 $\mu$ M 7-EC ergab sich eine 1,2-fache Zunahme an 7-HC. In der Spalte 3-MC + Proadifen beliefen sich diese Steigerungen auf Faktoren von 1,4 bzw. 1,7. Gründe können die, mit steigender 7-EC-Konzentration, zunehmende Toxizität auf die HaCaT- Zellen als auch eine Sättigung des Enzyms sein.

Das Verhalten der Inhibitoren kann, durch die im theoretischen Teil angesprochene, unspezifische Umsetzung des 7-ECs durch mehrerer CYP- Isoenzyme, bedingt sein. Da gerade  $\alpha$ -NP für die CYP 1- Familie als besonders spezifisch gilt, wäre die Umsetzung von 7-EC durch Enzyme der CYP- Familien 2 und 3 durch diesen Inhibitor nicht zu beeinflussen. Aufgrund der deutlichen Zunahme der Toxizität bei Steigerung der  $\alpha$ -NP- Konzentration in Kombination mit 7-EC, war es nicht möglich, die Ursachen für das Verhalten von  $\alpha$ -NP zu klären. Anders

verhält es sich bei Proadifen. Bereits im Kapitel 3.4.5 angesprochen, konnten Buening et al. und Anders et al. in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts für Proadifen sowohl hemmende als auch induzierende Effekte belegen [13-15;33;189]. Proadifen trug zu der Zeit noch die Bezeichnung SKF 525-A.

Nachfolgend sind die Ergebnisse umfangreicher Tests mit Induktion durch 3-MC oder Phenobarbital (PB) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Als Inhibitoren wurden  $\alpha$ -NP und Proadifen in je zwei Konzentrationen getestet. Die ermittelten Daten sind in der Abb. 5.3.27 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen zum Induktions- und Inhibitionspotential der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase bestätigten die aus Abb. 5.3.26 abgeleiteten Aussagen. In der Summe der Werte fielen die 7-HC- Spiegel für das Kontrolllevel etwas niedriger aus. Die gebildete Menge 7-HC nach 3-MC + Proadifen (50 $\mu$ M) lag durch die größere Anzahl an Werten etwas über den zuvor ermittelten.



**Abb. 5.3.27:**ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per  $\alpha$ - Naphthoflavon oder Proadifen

Konfluenz zu Versuchsbeginn 80%. Endkonzentration EC: 250 $\mu$ M. Die Induktionszeiten betragen 24h, die Zeit mit den Inhibitoren und EC lag ebenfalls bei 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, dabei war die Werteanzahl n unterschiedlich: Kontr. - (n = 43); 3-MC (2 $\mu$ M) - (n = 40); 3-MC +  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) - (n = 14); 3-MC + Pro (50 $\mu$ M) - (n = 10), für alle anderen (n = 5)

Insgesamt konnte durch 3-MC- Induktion in Abhängigkeit von dessen eingesetzter Konzentration eine Steigerung der 7-HC- Menge um den Faktor 13 bzw. 25 erreicht werden. Die nachfolgende Hemmung mit  $\alpha$ -NP führte zur Reduktion der 7-HC- Menge gegenüber den entsprechend induzierten Zellen. Der Wert nach 0,5 $\mu$ M  $\alpha$ -NP- Behandlung lag aber noch um den Faktor 8,2 über dem, der mit Medium behandelten Kontrollzellen. Der Einsatz von  $\alpha$ -NP 2,5 $\mu$ M senkte die 7-HC-Werte auf nur noch das doppelte des Kontrollniveaus, allerdings bei deutlicher Toxizität auf die Zellen (Im Lichtmikroskop war deren Schrumpfung zu erkennen.). Wie schon erwähnt, steigerte Proadifen (50 $\mu$ M) die 7-HC-Menge der zuvor mit 3-MC induzierten Zellen nochmals um den Faktor 1,3. Es konnten also in dieser Konzentration keine hemmenden Effekte ausgemacht werden. Anders verhielt es sich bei Verwendung von Proadifen 125 $\mu$ M. Hier wurde die 7-HC- Menge gegenüber den mit 3-MC-induzierten Zellen herabgesetzt, sie blieb aber dennoch 5-fach über dem Kontrolllevel. Optisch erschienen die

HaCaT- Zellen nach dieser Inhibition kaum beeinträchtigt, allerdings lies der MTT- Test für diese Proadifen- Konzentration mitochondriale Schäden vermuten (vgl. Kap. 5.2.2.4). Nicht geklärt werden konnte, ob die Hemmung der ECOD nach Proadifen (125 $\mu$ M) auf der Inhibition von CYP- Enzymen oder der Zunahme der Toxizität der Substanz beruhte. Denkbar ist auch eine Kombination beider Effekte. Der Nachweis der Toxizität wurde selbst erbracht (Abb. 5.2.32 + Tab. 5.2.3). Die Fähigkeit des Proadifen sowohl induzierend als auch hemmend auf Enzyme zu wirken, wurde bereits in der Literatur belegt [13-15;189].

Die nach Phenobarbital- Behandlung ermittelten 7-HC- Werte lagen, wie schon bei den EROD- Untersuchungen, für beide Konzentrationen unter den Medium- Kontrollwerten. Es wurde deshalb auf Testungen mit PB und Inhibitoren verzichtet.

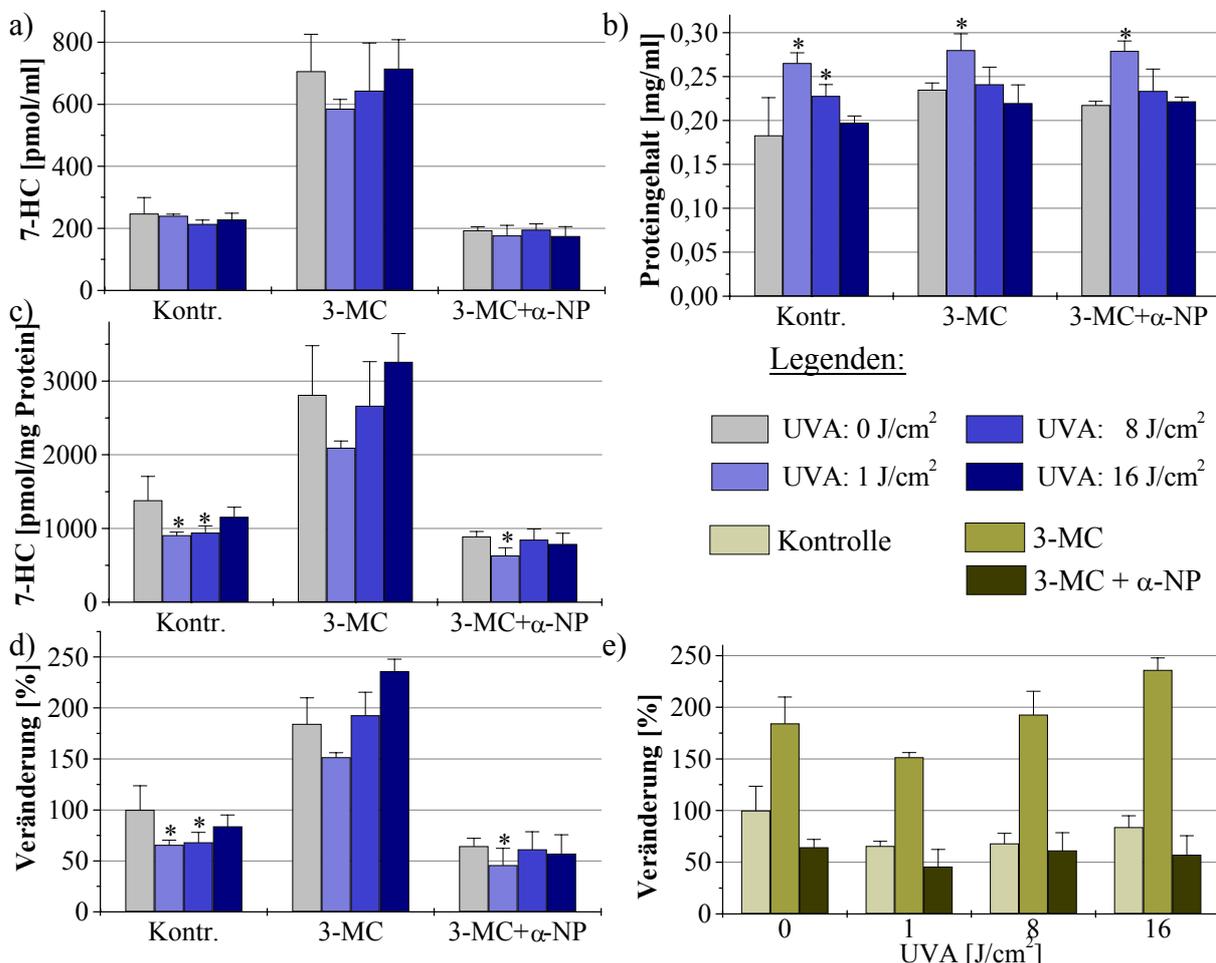
### 5.3.2.2 Einfluss von UVA- Strahlung

Um mit den Ergebnissen der EROD vergleichen zu können, erfolgte die Durchführung dieser Versuche analog. Der Ablauf der Bestrahlungsversuche ist in Kapitel 4.3.2.3 b) beschrieben. Das bedeutet,  $\alpha$ - NP wurde, trotz seiner erhöhten Toxizität in Kombination mit EC, in 1 $\mu$ Mer Konzentration getestet. Da Proadifen in den vorliegenden Untersuchungen der EROD keine Rolle spielte, wurde in den ECOD- Bestrahlungsversuchen darauf verzichtet. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass vorangegangene EROD- Untersuchungen für Proadifen (100 $\mu$ M) ergaben, dass nach UVA (8 J/cm<sup>2</sup>) das Level an Resorufin gegenüber vorheriger 3-MC- Induktion signifikant abnahm - auch gegenüber gleichbehandelten, unbestrahlten Zellen [51].

Als Induktor kam 3-MC (2 $\mu$ M) zum Einsatz. Auf die Testung von PB wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse verzichtet. Die Induktion erstreckte sich über 24 oder 48 Stunden. Die Zeit mit dem Substrat 7-EC (250 $\mu$ M) und dem Inhibitor  $\alpha$ - NP lag einheitlich bei 24h.

Die Abb. 5.3.28 zeigt unterschiedliche Aspekte der Deethylierung von 7-EC zu 7-HC nach vorheriger UVA- Bestrahlung. Es ist ein direkter Vergleich zur EROD (Abb. 5.3.11) möglich. Bei einem ersten Blick fallen sofort Unterschiede zwischen den einzelnen UVA- Dosen auf. Im Gegensatz zur EROD- Bestimmung lagen die Proteingehalte nach den verschiedenen Strahlendosen nicht durchweg über denen der Kontrollzellen, sondern die Bestrahlung mit 1 J/cm<sup>2</sup> erhöhte die Proteinmenge maximal, höhere Dosen vermochten dies in geringerem Umfang. Die Steigerung der UVA- Dosen lies den Proteingehalt bis hin auf das Niveau der Kontrollzellen sinken. Da sich die 7-HC- Werte (pmol/ml) der unterschiedlichen Strahlendosen nicht signifikant unterschieden, resultierte aus den differenzierten Proteinwerten vergleichsweise niedrige 7-HC-Werte in der Darstellungsform pmol/mg Protein. Für die Medium- Kontrollzellen bedeutete dies, die 7-HC- Werte nach 1 und 8 J/cm<sup>2</sup> lagen signifikant unter denen der unbestrahlten Kontrollen. Nach 3-MC- Induktion ergaben sich aufgrund der großen Standardabweichungen keine signifikanten Veränderungen. In der Gruppe 3-MC und  $\alpha$ -NP waren wiederum die 7-HC- Werte nach UVA 1 J/cm<sup>2</sup> signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Da die Bestrahlungsversuche bei einsetzender Konfluenz des HaCaT- Zellrasens begannen, unterschieden sich die hierbei ermittelten 7-HC-Werte von denen der vorangegangenen ECOD- Versuche, in denen der Versuchsbeginn bei 80%iger Konfluenz der Zellen lag. Insbesondere nach 3-MC- Induktion wurden die bisherigen Werte um das Dreifache unterschritten.

Für die Medium- Kontrollen ergaben sich 7-HC-Werte, die im Bereich von denen vorheriger Versuche lagen (vgl. Abb. 5.3.26). Die Werte mit  $\alpha$ -NP- Hemmung lassen sich nicht direkt mit vorangegangenen ECOD- Versuchen vergleichen, da unterschiedliche Inhibitor- Konzentrationen zum Einsatz kamen. Im Versuch mit  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) konnten die 7-HC- Werte nach vorheriger 3-MC- Induktion auf, bzw. zum Teil unter das Kontrollniveau gesenkt werden.



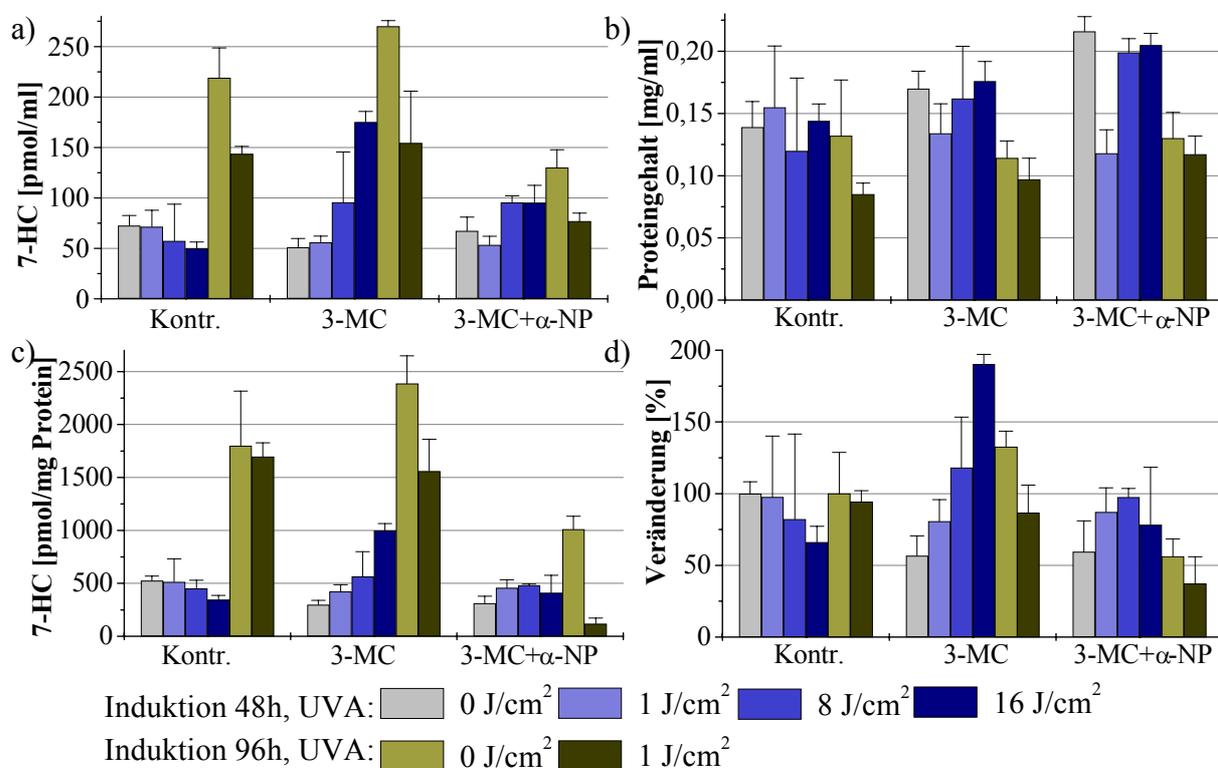
**Abb. 5.3.28:** ECOD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), EC (250 $\mu$ M). Induktion, Inhibition und EC in allen Fällen 24h. Die Abbildungen der prozentualen Veränderungen in d) und e) beziehen sich auf die Kontrolle unbestrahlt, ohne Induktor, ohne Inhibitor, zugrunde liegen die Werte 7-HC (pmol/mg Protein). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt; \*p < 0,05 gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle innerhalb einer Gruppe; einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Insgesamt lässt sich nach diesem Versuch sagen, dass, im Vergleich zur EROD- Bestimmung (Abb. 5.3.11 e) für die 7-Ethoxycoumarindeethylierung Unterschiede in den 7-HC- Werten nach den verschiedenen Strahlendosen ermittelt wurden. Die Ursache dafür lag vordergründig in der Beeinflussung der Proteinmengen.

Ein anderes Bild ergab sich nach 48h Induktion mit 3-MC (bzw. 48h Medium auf den Kontrollzellen). In den grauen und blauen Balken der Abb. 5.3.29 a) wird deutlich, dass der Wert für 7-HC der Kontrolle sehr niedrig lag. Verglichen mit der vorherigen Abbildung, den 24h behandelten Zellen, beliefen sich die Werte mit 50 bis 73 pmol/ ml auf nur noch ein Drittel bis ein Viertel, obwohl länger inkubiert wurde. Aus Abb. 5.3.29 a) ist erkennbar, dass mit zu-

nehmender UVA- Dosis die 7-HC-Werte der Kontrolle abnahmen, wogegen die der 3-MC induzierten Zellen zunahmen. Eine weitere Besonderheit bestand darin, dass, bei Bestrahlung der HaCaT- Zellen mit  $1 \text{ J/cm}^2$  und den nicht bestrahlten Zellen, sich nach 3-MC- Behandlung keine Erhöhung der 7-HC- Menge ergab. Sowohl die HC- Werte für Kontrolle, Induktion als auch Induktion + Inhibition beliefen sich im selben Bereich von 50 bis 73 pmol/ ml. In alle Abbildungen integriert wurde ein weiterer Versuch, die Inkubation mit 3-MC (oder Medium) über 96h und die nachfolgende Bestrahlung mit  $1 \text{ J/cm}^2$  UVA oder ohne Bestrahlung (grüne Balken). Sämtliche Proteingehalte waren sehr heterogen mit teilweise großen Standardabweichungen. Es wurde deutlich, dass mit dem Alter der Zellen der Proteingehalt sank und er sich nach zusätzlicher UVA- Bestrahlung noch weiter verminderte. Dies deutete auf zunehmende Zellschädigung hin. Sind einzelne Zellen so geschädigt, dass ihr Inhalt austritt, verringert sich der messbare Proteingehalt der Zellen, da mit dem BioRad- Protein- Assay nur die Proteine aus intakten, fest am Boden haftenden Zellen bestimmt werden (siehe Kap 4.4).



**Abb. 5.3.29:** ECOD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC über verschiedene Zeiten und Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavon

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC ( $2 \mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -NP ( $1 \mu\text{M}$ ), EC ( $250 \mu\text{M}$ ). Induktion 48 oder 96h, Inhibition und EC in allen Fällen 24h. Die Abbildungen der prozentualen Veränderungen in d) beziehen sich auf die zeitgleiche Kontrollgruppen unbestrahlt, ohne Induktor, ohne Inhibitor, zugrunde liegen die Werte 7-HC (pmol/mg Protein). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 5$  Experimenten dargestellt.

Die Untersuchung mit 96-stündiger Induktion wurde durchgeführt, da, wie bereits erwähnt, nach 0 bzw.  $1 \text{ J/cm}^2$  UVA und 48h Induktion mit 3-MC keine erhöhten Werte für 7-HC nachweisbar waren. Die UVA- Dosen von 8 und  $16 \text{ J/cm}^2$  erbrachten nach 48h 3-MC eine Induktion gegenüber den gleich behandelten Kontrollzellen von 1,2 bzw. 2,9, die mit  $\alpha$ -NP wieder auf das Kontrollniveau gesenkt werden konnten. Nach 96-stündiger Induktion lag der 7-HC-Wert der unbestrahlten Proben mit  $218 \text{ pmol/ml}$  im Bereich der Werte nach 24-stündiger In-

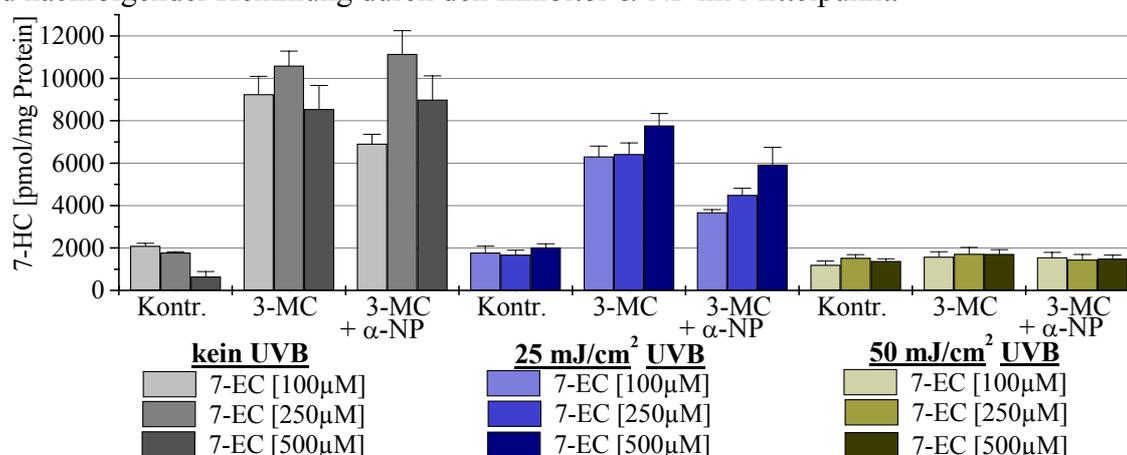
duktion. Durch  $1 \text{ J/cm}^2$  UVA (96h 3-MC) sank der Wert für 7-HC in allen Fällen unter die Werte der unbestrahlten Kontrolle. Obwohl gleichzeitig der Proteingehalt abnahm, fielen auch in der Darstellungsform 7-HC (pmol/mg Protein) die 7-HC- Werte der unbestrahlten Proben höher, als die UVA- bestrahlten Proben aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, wenn eine Induktion durch 3-MC erfolgte, dann nahm sie mit steigender UVA- Dosis fast immer zu – einzige Ausnahme: nach 96h Induktion sank der Wert (vermutlich aufgrund von Toxizitäten und Alter der Zellen in Kultur). Jedoch fiel die Induktionsrate verglichen mit den Versuchen, die bei geringerer Konfluenz des Zellrasens begannen, sehr gering aus. Das Verhalten der mit Medium behandelten HaCaT- Zellen war nicht eindeutig. Eine UVA- Bestrahlung vermochte es nicht, die gebildete Menge 7-HC gegenüber den unbestrahlten Zellen zu erhöhen, im Gegenteil, fast alle Werte lagen unter denen der unbestrahlten Proben. Der Einsatz des Inhibitors  $\alpha$ - NP ( $1 \mu\text{M}$ ) führte zu 7-HC-Werten, die nie über dem Kontrollniveau lagen, ganz gleich wie und wie lange die Zellen inkubiert wurden.

Zu den vorangegangenen Ergebnissen ohne UV- Bestrahlung lassen sich aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse erweiterte Aussagen ableiten. Die Konzentration  $\alpha$ -NP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) und das Arbeiten mit Zellen, die sich noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, führten dazu, dass die Werte nach 3-MC- Induktion nicht wieder auf das Kontrolllevel abgesenkt werden konnten. Offensichtlich war der induzierende Effekt des 3-MC auf unkonfluente Zellen so stark, das selbst  $\alpha$ -NP ( $2,5 \mu\text{M}$ ) ihn nicht komplett hemmen konnte. Dagegen vermochte  $\alpha$ -NP ( $1 \mu\text{M}$ ) an konfluenten HaCaT- Zellen die 7-HC-Werte nach 3-MC- Induktion auf Kontrollniveau zu reduzieren (vgl. Abb. 5.3.27 und die beiden darauf folgenden).

### 5.3.2.3 Einfluss von UVB- Strahlung

Nach erfolgter UVB- Bestrahlung der HaCaT- Zellen wurden verschiedene Aspekte der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung untersucht. Zunächst stand die Bestimmung der Deethylierungsraten unterschiedlicher 7-EC- Konzentrationen in Kombination mit dem Induktor 3-MC und nachfolgender Hemmung durch den Inhibitor  $\alpha$ -NP im Mittelpunkt.

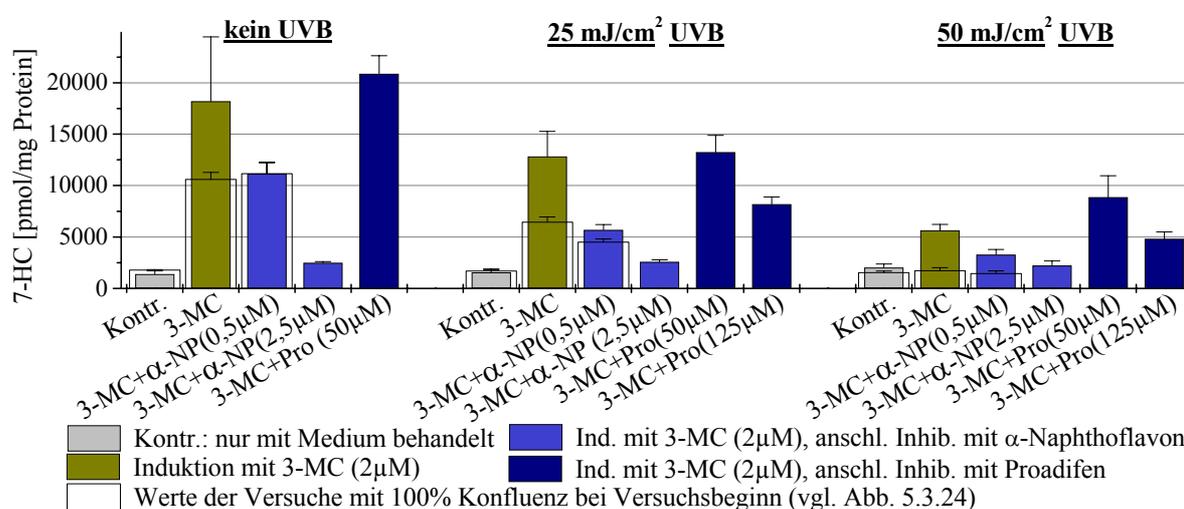


**Abb. 5.3.30:** ECOD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Endkonzentrationen: 3-MC ( $2 \mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -NP ( $0,5 \mu\text{M}$ ). Die Induktionszeit betrug 24h, die Zeit mit dem Inhibitor und EC lag ebenfalls bei 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, die Anzahl der Werte lag bei  $n = 5$  für Kontr. und 3-MC;  $n = 4$  für 3-MC +  $\alpha$ -NP.

Die Abbildung 5.3.30 veranschaulicht ganz deutlich, dass mit zunehmender UVB- Dosis die induktive Kapazität der HaCaT- Zellen auf die ECOD abnahm. In gleichem Maß fielen auch die 7-HC-Werte nach 3-MC- Induktion und nachfolgender  $\alpha$ -NP- Hemmung geringer aus. Im Gegensatz dazu blieben die 7-HC-Werte des Basallevels (=Kontr.) verhältnismäßig konstant, ganz gleich, wie intensiv die UVB- Bestrahlung war. Die durch den Einsatz unterschiedlicher EC- Konzentrationen bedingten Veränderungen waren heterogen und unterlagen keinem grundsätzlichen Trend. Im Weiteren wurde die Konzentration EC auf 250 $\mu$ M begrenzt.

Als nächstes wurde untersucht, ob der Einsatz von  $\alpha$ -Naphthoflavin in der Konzentration 2,5 $\mu$ M gegenüber der 0,5 $\mu$ M-en Verwendung zu einer deutlicheren Reduktion der, nach vorheriger 3-MC-Induktion erhaltenen, 7-HC- Werte führte. Es wurde in dem Zusammenhang ein weiterer möglicher Inhibitor (Proadifen) in zwei Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse gibt Abb. 5.3.31 wieder. Der Versuch begann bei einer Konfluenz des Zellrasens von 80%.

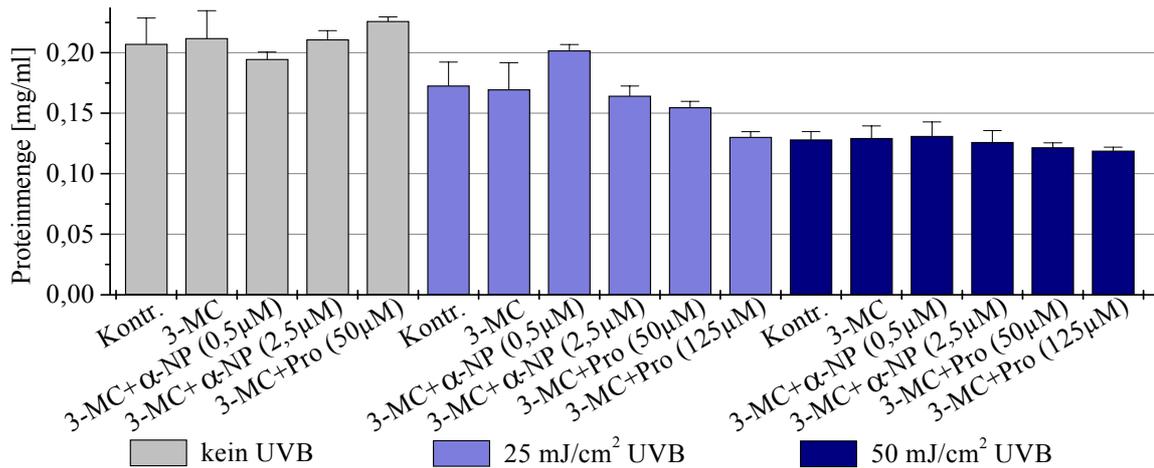


**Abb. 5.3.31:** ECOD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC, Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin oder Proadifen

Konfluenz zu Versuchsbeginn 80%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M), EC (250 $\mu$ M). Induktion, Inhibition und EC in allen Fällen je 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, die Werteanzahl n war unterschiedlich: Kontrolle (n = 16); 3-MC (n = 16); alle übrigen (n = 5)

Der Abbildung 5.3.31 liegen mehr Werte zugrunde als dem vorangegangenen Versuch der Abb. 5.3.30, es bestätigte sich, dass mit zunehmender UVB- Bestrahlung die induktive Kapazität (3-MC-induziert) der HaCaT- Zellen hinsichtlich der ECOD abnahm. Analog verhielten sich die Werte mit nachfolgender Hemmung durch  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M). Für die Behandlung mit 3-MC +  $\alpha$ -NP (2,5 $\mu$ M) lagen alle HC-Werte in einem Bereich um 2500 pmol/mg Protein, ganz gleich, wie sie bestrahlt wurden. Eine sich an die 3-MC-Induktion anschließende Zugabe von Proadifen (50 $\mu$ M) ergab 7-HC-Werte, die im Bereich der alleinigen 3-MC-Induktion und zum Teil darüber lagen. Die Verwendung von Proadifen (125 $\mu$ M) führte demgegenüber zu geringeren 7-HC-Mengen. Wie schon mehrfach angesprochen, erwies sich diese Konzentration als sehr toxisch im MTT- Test. Aus diesem Grund lag der Erniedrigung der 7-HC-Werte weniger die Beeinflussung der CYP- Enzyme, als vielmehr die Schädigung der Zellintegrität zugrunde. Bisher wurde für die UVB-Versuche noch nichts zu den Proteingehalten erwähnt.

Die Abb. 5.3.32 gibt die Proteingehalte zu den Versuchen aus Abb. 5.3.31 wieder.



**Abb. 5.3.32:** Proteingehalt nach ECOD an HaCaT nach UVB, Induktion durch 3-MC und Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavon oder Proadifen – zu Abb. 5.3.31

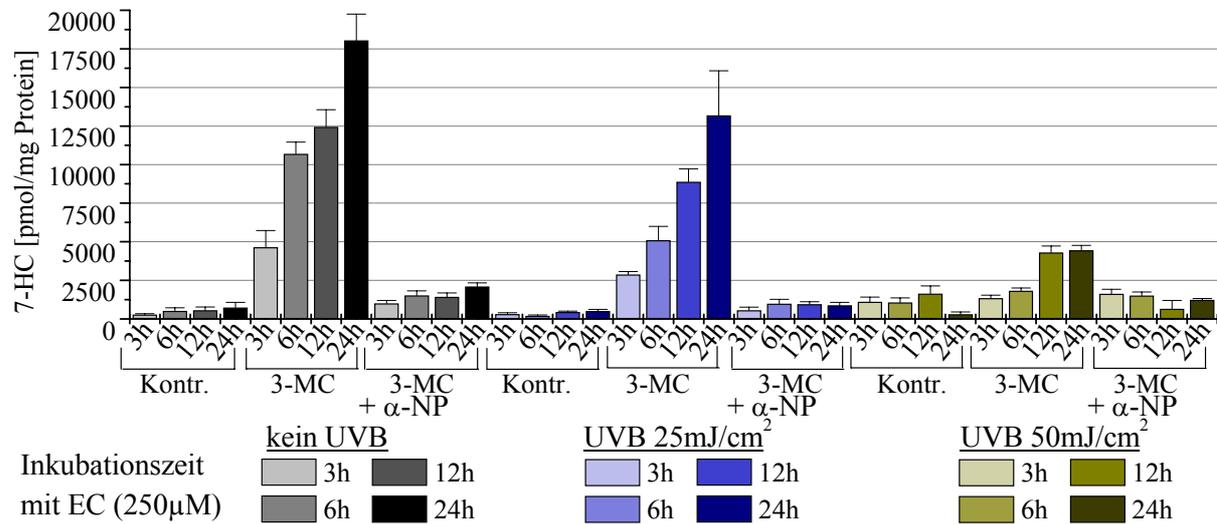
Konfluenz zu Versuchsbeginn 80%. Endkonzentrationen: 3-MC (2µM), EC (250µM). Induktion, Inhibition und EC in allen Fällen je 24h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, die Werteanzahl n war unterschiedlich: Kontr. (n = 16); 3-MC (n = 16); alle übrigen (n = 5)

Es wird ersichtlich, dass der Proteingehalt sich mit steigenden UVB- Dosen verringerte. Eine Abnahme des Proteingehaltes deutet, wie schon erläutert, auf Schädigungen der Zellen hin, die den Verlust oder zumindest die Herabsetzung der Membranintegrität zur Folge haben. Der MTT- Test an nur mit Medium behandelten HaCaT- Zellen ließ, selbst 128 Stunden nach UVB- Bestrahlung, diese Toxizität nicht vermuten (vgl. Abb. 5.3.10). Bezieht man allerdings die Toxizität des Substrates EC in die Überlegungen ein (Abb. 5.2.19 – Kapitel 5.2.2.1), sind die ermittelten Daten der Proteinmengen erklärbar.

Die transparenten Balken in der Abb. 5.3.31 geben nochmals die Werte aus Abb. 5.3.30 wieder – ermittelt unter fast identischen Bedingungen, lediglich die Konfluenz zu Versuchsbeginn unterschied sich. Es wird bei diesem Vergleich deutlich, dass die induktive Kapazität der HaCaT- Zellen hinsichtlich der ECOD für unkonfluente Zellen größer war. Dagegen blieb das Basallevel unverändert, auch die Auswirkungen auf induziert und anschließend gehemmte Zellen waren weniger ausgeprägt. Dass für Zellen, die noch keinen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, die 7-HC-Werte nach der Induktion höher ausfielen, war gewiss auch von der Zeit abhängig. Nach der Bestrahlung vergingen durch den Versuchsablauf mit Induktion, Inhibition und Substratumsetzung mindestens 72 Stunden. Eine Zeitspanne, in der unkonfluente Zellen und, insbesondere induzierte Zellen, allein durch ihr Wachstum und den damit verbundenen Zellzuwachs in der Lage waren, mehr Substrat umzusetzen. Hingegen waren konfluente Zellen in geringerem Umfang in der Lage, sich zu teilen. Diese Tatsache hat beispielsweise zur Folge, dass irreversible Eingriffe in enzymatische Vorgänge der Zellen eines konfluenten Zellrasens, weniger durch die Bildung neuer Zellen kompensiert werden können und somit die Folgen des Eingriffs deutlicher sichtbar werden.

Da der Einfluss der Konfluenz deutliche Auswirkungen zeigte, wurde noch ein weiterer Aspekt der ECOD untersucht. Nach UVB- Bestrahlung von 0, 25 und 50 mJ/cm<sup>2</sup> wurde mit 3-MC induziert (2µM, 24h) und anschließend mit  $\alpha$ -NP (2,5µM) inhibiert. Die Umsetzung mit

7-EC (250 $\mu$ M) erfolgte - gemeinsam mit dem Inhibitor - nicht wie üblich nur für 24h, sondern auch 12, 6 und 3 Stunden. Damit die Zellen bei der Umsetzung mit 7-EC noch nicht konfluent sind, wurde mit der Bestrahlung bei maximal 60%iger Konfluenz des Zellrasens begonnen. Bis zur ECOD vergingen je nach Versuch 51 bis 72 Stunden. Bei Versuchsende der längsten Inkubationszeit setzte gerade die Konfluenz ein. Die Abb. 5.3.33 veranschaulicht die ermittelten 7-Hydroxycoumarinwerte.



**Abb. 5.3.33:** ECOD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC, Hemmung per  $\alpha$ -Naphthoflavin

Konfluenz zu Versuchsbeginn max. 60%. Endkonzentrationen: 3-MC (2 $\mu$ M),  $\alpha$ -NP (2,5 $\mu$ M) EC (250 $\mu$ M). Induktion in allen Fällen 24h; Inhibition und EC 3, 6, 12 oder 24h (laut Diagramm). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt.

Mit zunehmender Inkubationszeit nahmen die 7-HC- Werte zu. Es bestätigte sich in diesem Versuch, dass mit steigender UVB-Dosis die 7-HC-Werte bei gleichen EC-Inkubationszeiten abnahmen. Je höher die Umsatzraten ausfielen, umso weniger vermochte  $\alpha$ -NP die Werte nach 3-MC- Induktion vollständig auf das Kontrollniveau herabzusetzen.

Nach 24h Induktion und 24h 7-EC wurde ohne Bestrahlung die größte induktive Kapazität ermittelt (24,5-fach über dem Kontrollniveau). Durch den 24-stündigen Einsatz von  $\alpha$ -NP (2,5 $\mu$ M) konnte dieser Wert signifikant herabgesetzt werden, lag aber noch 2,8-fach über der uninduzierten Kontrolle. Nach Bestrahlung der HaCaT- Zellen mit 25 und 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB wurden nach 3-MC-Induktion geringere 7-HC-Werte erhalten, die durch den Inhibitor  $\alpha$ -NP letztlich ganz auf das Niveau der Kontrollwerte ohne Induktion abgesenkt werden konnten.

Für die UVB- Bestrahlung kann zusammenfassend festgestellt werden, dass mit steigender UVB- Dosis die Menge an 7-Hydroxycoumarin, gebildet nach Induktion mit 3-MC, rückläufig war. In der Konsequenz fielen auch die 7-HC-Werte, die nach Induktion mit nachfolgender  $\alpha$ -NP- Hemmung ermittelt wurden, entsprechend geringer aus. Die Medium- Kontrollwerte, welche weder induziert noch inhibiert wurden, sondern lediglich mit dem Substrat 7-EC umgesetzt wurden, zeigten keine Beeinflussung durch die UVB-Bestrahlung.

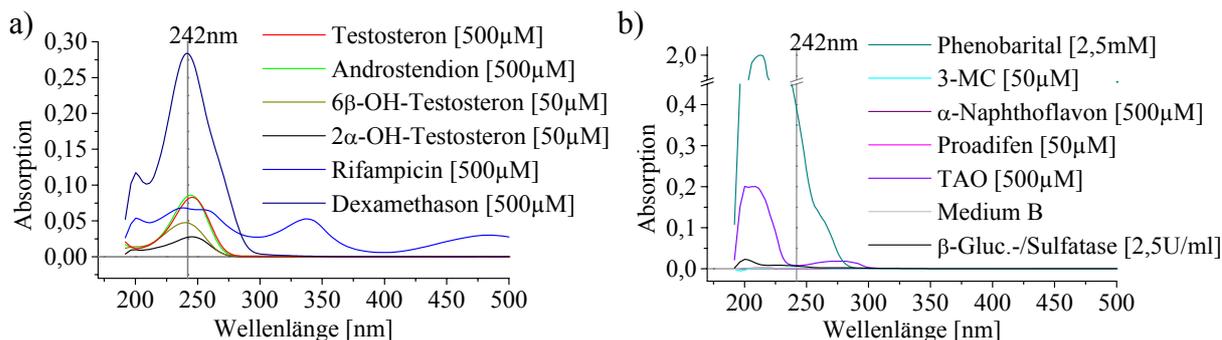
Weder unterschiedliche EC-Konzentrationen, noch das Arbeiten mit Zellen unterschiedlicher Konfluenz, noch verschiedene EC-Inkubationszeiten änderten etwas daran, dass mit steigender UVB- Dosis die induktive Kapazität der HaCaT- Zellen sank.

### 5.3.3 Testosteron- Metabolisierung

Bei der Ermittlung der durch HaCaT- Zellen gebildeten Testosteron- Metabolite stand die Charakterisierung der Hydroxylierungsprodukte im Mittelpunkt, insbesondere die Bildung des CYP3A4- vermittelten 6 $\beta$ - OH- Testosteron sollte festgestellt werden.

#### 5.3.3.1 Charakterisierung aller bei der Umsetzung relevanter Substanzen

Bevor die eigentlichen Versuche an HaCaT- Zellen beginnen konnten, wurde von allen, mit den Zellen in Verbindung kommenden und möglicherweise miterfassbaren Substanzen ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Abbildung 5.3.34 zeigt die erhaltenen Spektren.



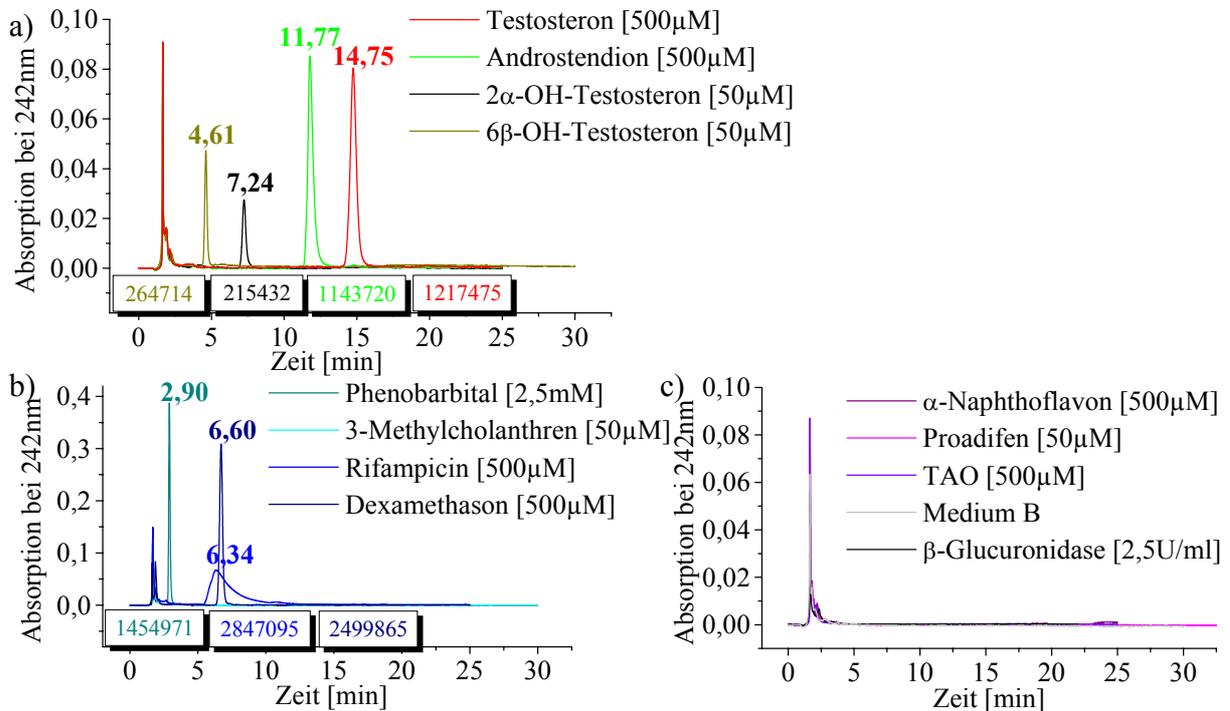
**Abb. 5.3.34:** Absorptionsspektren aller bei der Testosteron- Metabolisierung zum Einsatz kommenden Substanzen (gelöst in DMSO und Medium B)

Die Darstellung in zwei Diagrammen dient der Übersichtlichkeit. Es sind jeweils grau waagrecht die Nulllinie und senkrecht eine Linie bei 242nm eingezeichnet, die Wellenlänge, die der späteren Extinktionswellenlänge entspricht. Die hier getesteten Konzentrationen überschreiten zumeist weit die in den Versuchen an HaCaT- Zellen tatsächlich eingesetzten. Der DMSO- Gehalt lag oft über den für die Zellen tolerablen 0,5%.

Die obigen Abbildungen machen deutlich, dass bei 242 nm sowohl das Testosteron als auch die Metabolite Androstendion, 2 $\alpha$ -OH-T und 6 $\beta$ -OH-T ein Absorptionsmaximum besitzen. Daneben könnten aufgrund der ebenfalls hohen Absorptionswerte bei dieser Wellenlänge die Substanzen Dexamethason, Rifampicin und Phenobarbital Einfluss auf die chromatographische Trennung haben. Für alle weiteren Verbindungen war nicht mit überlagernden Effekten zu rechnen. Bei allen drei Substanzen handelt es sich um potentielle Induktoren. Das bedeutet, sie wurden von den Zellen entfernt, bevor das Substrat Testosteron auf die Zellen gegeben wurde. Durch die verbleibende, minimale Konzentration schien der mögliche Einfluss auf den Assay gering, da letztlich in der Untersuchungslösung, die per HPLC vermessen wurde, nur Spuren der genannten Verbindungen zu finden sein sollten. Für genaue Aussagen wurden mit den Lösungen aus den spektralen Versuchen Chromatogramme unter Assay- Bedingungen aufgenommen. Die Ergebnisse zeigt Abb. 5.3.35.

Mit einer Retentionszeit von 2,9 min hatte Phenobarbital keinen Einfluss auf die Eluation von Testosteron und dessen Metaboliten. Ebenso wenig beeinträchtigte Dexamethason den Nachweis, das mit einer Retentionszeit von 6,6 min zwischen 2 $\alpha$ -OH- und 6 $\beta$ -OH- Testosteron bestimmt wurde. Anhand der Chromatogramme wäre eine Überlagerung des 2 $\alpha$ -OH-T Peaks durch Rifampicin möglich. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Rifampicin- Konzentration von 500 $\mu$ M für die Metabolisierungs- Versuche irrelevant war. Als Induktor kam Rifampicin nur in 10 $\mu$ M-er Verdünnung zum Einsatz und wurde, wie oben erwähnt, aus der Analy-

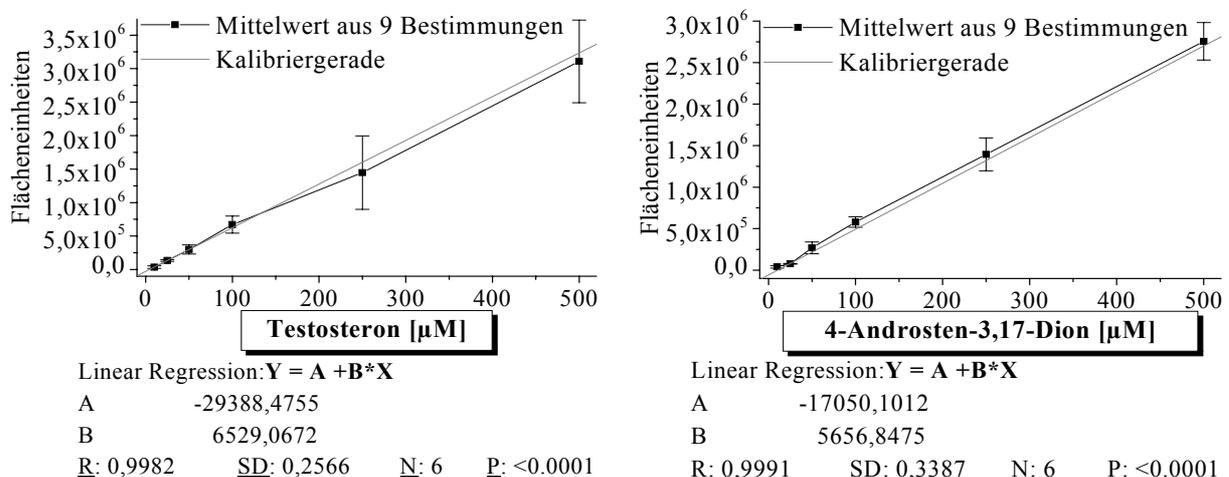
senlösung entfernt, ehe diese zur Extraktion kam. Damit sollten, wenn überhaupt, nur winzigste Mengen von Rif bis zur DAD- Detektion gelangen. Unabhängig davon diente  $2\alpha$ -OH-Testosteron hauptsächlich als Negativkontrolle, da dieser Metabolit bislang nur bei Nagern und nicht in humanem Gewebe nachweisbar war (siehe Kap.3.5.3.3).



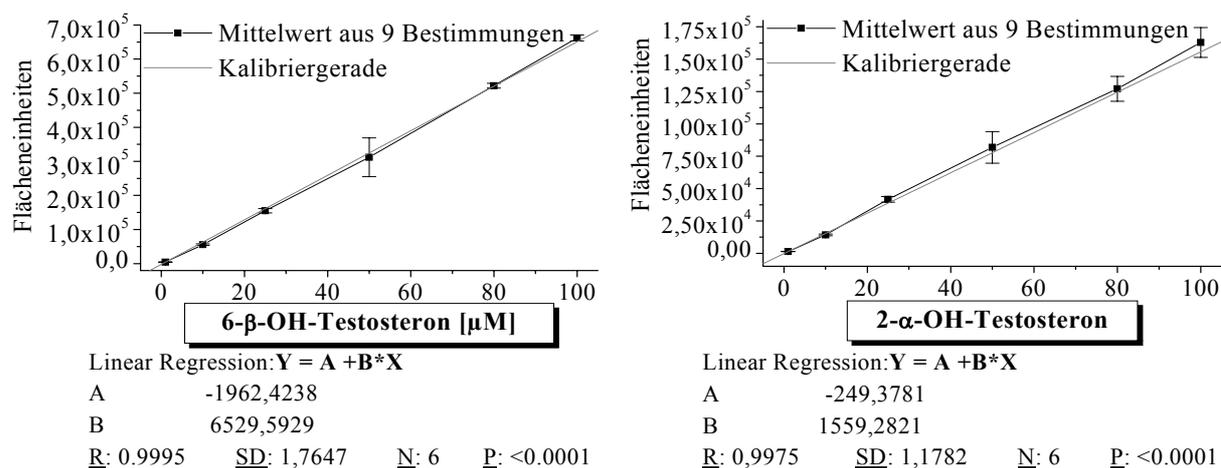
**Abb. 5.3.35:** Chromatogramme aller bei der Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Zellen verwendeten Substanzen

a) authentische Standardsubstanzen b) potentielle Induktoren c) Inhibitoren, Glucuronidas- Gemisch, Medium  
Laufmittel: Methanol/ Wasser (60:40); 1,0 ml/min, 25°C; Das Injektionsvolumen lag bei 20µl.

Die Spektren wurden bei der Wellenlänge 242 nm ausgewertet, die Aufzeichnung eines gesamten Laufes erstreckte sich über einen Wellenlängenbereich von 210 nm bis 350 nm, so dass es für jeden Peak anhand des zugehörigen Absorptionsprofils problemlos möglich war, festzustellen, zu welcher Verbindung er gehörte. Die unter Kapitel 4.3.3.1 angesprochenen Kalibriergeraden der Standardlösungen von Testosteron, Androsteron,  $2\alpha$ -OH-T und  $6\beta$ -OH-Testosteron sind in der Abb. 5.3.36 dargestellt.



**Abb. 5.3.36:** Kalibriergeraden von Testosteron, Androsteron, (Teil 1)



**Abb. 5.3.36:** Kalibriergeraden von 2α-OH- und 6β-OH-Testosteron (Teil 2)

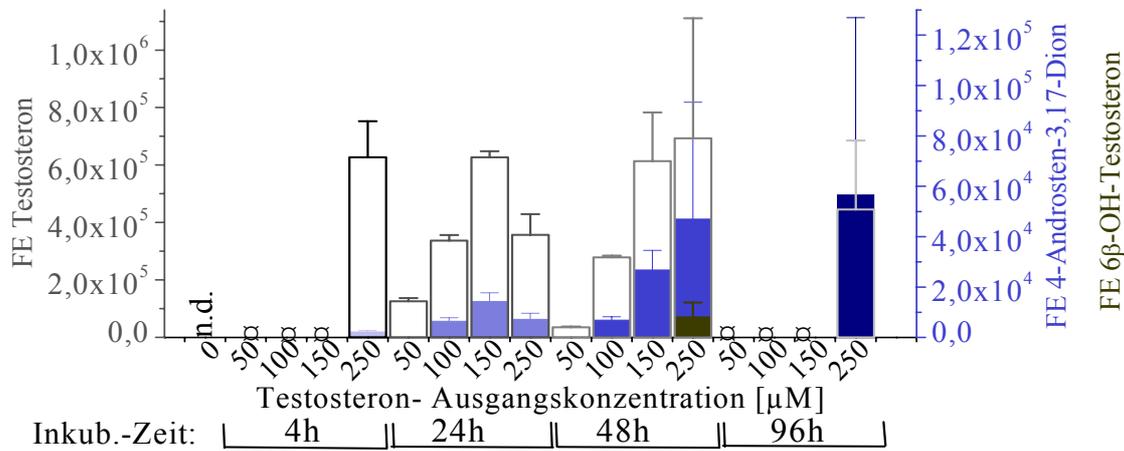
Substanzen gelöst in Methanol (HPLC). Je Substanz und je Konz. 3 unabhängige Lösungen hergestellt und diese 3fach vermessen. Das Injektionsvolumen lag bei 20μl. Laufmittel: Methanol/ Wasser (60:40); 1,0 ml/min, 25°C

### 5.3.3.2 Bestimmung der Grundaktivität

Die Auswahl der Testosteronkonzentrationen geschah in Anlehnung an die Literatur (250μM [203]; 50/250μM [204]; 250μM [54]) und unter Berücksichtigung vorheriger Toxizitätstests (vgl. Abb. 5.2.3 und 5.2.21). Da in den Angaben der Literatur der Einsatz von Testosteron 250μM vorherrschte, wurde diese Konzentration in die eigenen Studien integriert, obwohl MTT- und NR- Test an halbkonfluenten HaCaT- Zellen deutlich toxische Effekte auf die Zellen zeigten. Bei der Verwendung von Testo (250μM) auf konfluente Monolayer minimierte sich die Toxizität. Die Lebensfähigkeit nach 48stündiger Inkubation stieg auf über 80% (siehe Kap. 5.2.1 + 5.2.2). Wie dort verdeutlicht, erwiesen sich auch die potentiellen Metabolisierungsprodukte 4-Androsten-3,17-Dion (Andro), 6β-OH-Testosteron und ganz besonders das 2α-OH-Testo mit steigenden Konzentrationen auf halbkonfluente HaCaT- Zellen als erheblich toxisch. Dies war im NR- Test noch deutlicher ausgeprägt, als im MTT- Test. Das 2α-OH-Testo gilt als ein Metabolit, der charakteristisch für Ratten und Mäuse ist und dort vorwiegend über CYP2C11 und 2C6 gebildet wird [75;101;114]. Beim Menschen konnte dieser Metabolit noch nicht ermittelt werden. Das 2α-OH-Testo neben dem, hauptsächlich für CYP3A4 typischen Metabolit 6β-OH-Testo, zu den eigenen Untersuchungen heranzuziehen, diente, wie bereits erwähnt, als Negativkontrolle. Es wurde davon ausgegangen, dass kein 2α-OH-Testo aus der Metabolisierung von Testosteron in HaCaT- Zellen hervorgehen würde.

Die Testosteron- Metabolisierungen wurden zunächst auf die Abhängigkeit von der Inkubationszeit sowie die Abhängigkeit von der Substrat- Konzentration untersucht. Die dabei ermittelten Werte gibt Abb. 5.3.37 wieder. Es wird deutlich, dass aus Testosteron (250μM) gebildetes Andro bereits nach 4h nachweisbar war. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg für diese Testo- Konzentration die Menge Andro. Es konnte nicht der Nachweis erbracht werden, dass höhere Testo- Konzentrationen zwangsläufig zu größeren Mengen an Andro führten - z.B. war nach 24stündiger Inkubation die aus Testo (150μM) gebildete Menge Andro größer, als die mit Testo (250μM) erhaltene. Es fielen die großen Schwankungen unter gleich behandelten Proben auf. Wie im Kapitel 4.3.3.2 a) beschrieben, wurden immer von je 6 Proben nur

die Medien extrahiert und von je 6 gleich behandelten Proben die Medien inkl. Zellsuspension verwendet. In der Abb. 5.3.37 sind diese zwölf Werte gemittelt. Es stellte sich aber heraus, dass aus den Proben mit der gesamten Zellsuspension größere Produktmengen gewonnen werden konnten. Diese Tendenz war mit zunehmender Menge an Metabolisierungsprodukten immer deutlicher ausgeprägt, deshalb wurde bei allen folgenden Versuchen nur noch mit der gesamten Zellsuspension gearbeitet.



□ = nicht ermittelt    n.d. = nicht detektierbar

**Abb. 5.3.37:** Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten bei unterschiedlicher Ausgangskonzentration und variierender Inkubationszeit mit dem Substrat

Konfluenz der Zellen bei Testo- Zugabe ca. 80%. Der x- Wert 0 bedeutet, es wurde nur reines Medium umgesetzt und bestimmt, dies geschah zu allen Zeiten, es wurde nie etwas detektiert, deshalb im Diagramm nur einmal aufgeführt. Für 4h und 96h wurde nur Testo [250µM] untersucht. Alle blauen Balken geben Androstendion-Werte an, die entsprechenden Flächeneinheiten (FE) befinden sich an der rechten Seite. Grün abgebildet sind 6β-OH-Testo-Werte, ebenfalls rechts skaliert. Alles andere sind Testosteron- FE mit der Skala auf der linken Seite. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 12 Experimenten.

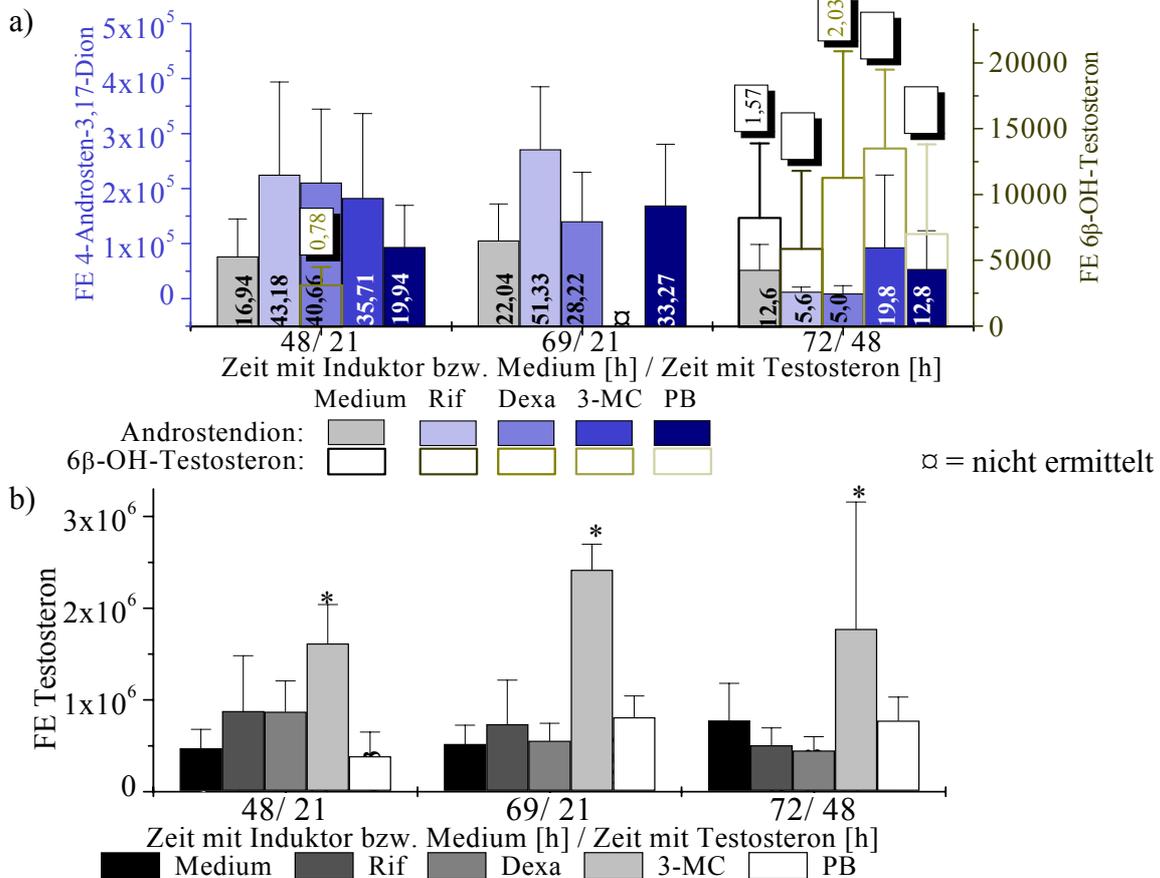
Bei der Ermittlung der Grundaktivität der Metabolisierung von Testosteron ergab sich die Bildung von 6β-OH-Testosteron, allerdings nur in 5 Proben und nur nach 48h mit Testosteron (250µM). Vergleicht man das Verhältnis Andro/ Testo nach 96h Testo (250µM) mit dem Wert nach 48h, stellt man fest, je mehr Produkt entstand, umso weniger Testo blieb noch vorhanden. Dies war nicht in allen Fällen so, wie ein Vergleich von Andro/ Testo nach 24h und 48h für Testo (250µM) zeigt.

Als Fazit aus der Grundumsetzung von Testosteron ist festzustellen, es wird hauptsächlich Androstendion gebildet, das tendenziell mit steigender Konzentration Testo und längerer Inkubationszeit zunimmt. Dagegen konnte der CYP3A4- vermittelte Testosteron- Metabolit 6β-OH-Testo nur sporadisch nachgewiesen werden.

### 5.3.3.3 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren

Wie in den Untersuchungen der EROD- und ECOD- Aktivitäten wurden auch hier mögliche Induktoren und Inhibitoren getestet. Für beide Aspekte kam eine Vielzahl von Arzneistoffen in Frage, da ein großer Teil der am Markt befindlichen Arzneistoffe über das CYP3A4 abgebaut wird. Gleichzeitig vermögen diese Substanzen das Enzym zu induzieren oder zu inhibieren. Aufgrund der vielfältigen Verwendung in der Literatur fiel die Auswahl auf Rifampicin (Rif) und Dexamethason (Dexa) als potentielle CYP3A4- INDUKTOREN. Die Auswahl ihrer

Konzentrationen geschah in Anlehnung an Daten der Literatur verbunden mit den eigenen Toxizitätstests. So kamen Rif (10 $\mu$ M) und Dexa (25 $\mu$ M) zum Einsatz [52;86;119;160;211]. Zusätzlich wurde der Einfluss der bisher verwendeten Induktoren 3-MC und PB untersucht.



**Abb. 5.3.38:** Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten nach vorheriger Inkubation mit verschiedenen Induktoren über 48h, 69h und 72h sowie mit unterschiedlichen Zeiten der Testosteroninkubation

Versuchsbeginn bei gerade einsetzender Konfluenz. Endkonzentrationen.: Rif (10 $\mu$ M); Dexa (25 $\mu$ M); 3-MC (2 $\mu$ M); PB (1mM); Testo (250 $\mu$ M). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 3 bis 22 Experimenten.

a) Darstellung der gebildeten Mengen Androstendion und 6 $\beta$ -OH-Testosteron

Alle blauen/grauen Balken geben Androstendion- Werte an, die entsprechenden Flächeneinheiten (FE) befinden sich an der linken Seite. Die Werte in den Balken nahe der X-Achse geben die zu den FE gehörenden, anhand der Kalibriergeraden berechneten, Konzentrationen Andro in  $\mu$ M an. Grün/schwarz abgebildet sind die 6 $\beta$ -OH-Testo-Werte, rechts skaliert. Die dazugehörigen Konz. stehen oberhalb der entsprechenden Balken. Die statistische Auswertung ergab per einseitiger ANOVA und Bonferroni's multiplem Vergleichstest für alle Andro- Werte bezogen auf die jeweilige Kontrolle  $p > 0,05$ , gleiches galt für die 6 $\beta$ -OH-Testo Werte.

b) Darstellung der nach der Umsetzung noch vorhandenen Mengen Testosteron

Die Werte in den Balken geben berechneten Konzentrationen Testo [ $\mu$ M] an. \* $p < 0,05$  gegenüber der Medium- Kontrolle, einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die Abbildung 5.3.38 a) stellt die Inkubation mit den vier Induktoren sowie mit Medium als Kontrolle über 48h, 69h und 72 Stunden dar. Die entsprechende Zeit mit Testosteron lag bei 21h oder 48h. Dabei wird aus den blauen Balken deutlich, dass die Induktionszeit relativ geringen Einfluss auf die *Bildung von Androstendion* hat. Dagegen wurde nach 21h mit Testo deutlich mehr Andro nachgewiesen, als nach 48stündiger Testosteron- Inkubation. Mit der CYP3A4- vermittelten *Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testo* verhielt es sich genau umgekehrt. War nach 21stündiger Testo- Inkubation nur in 3 Proben und auch nur nach vorheriger Induktion mit

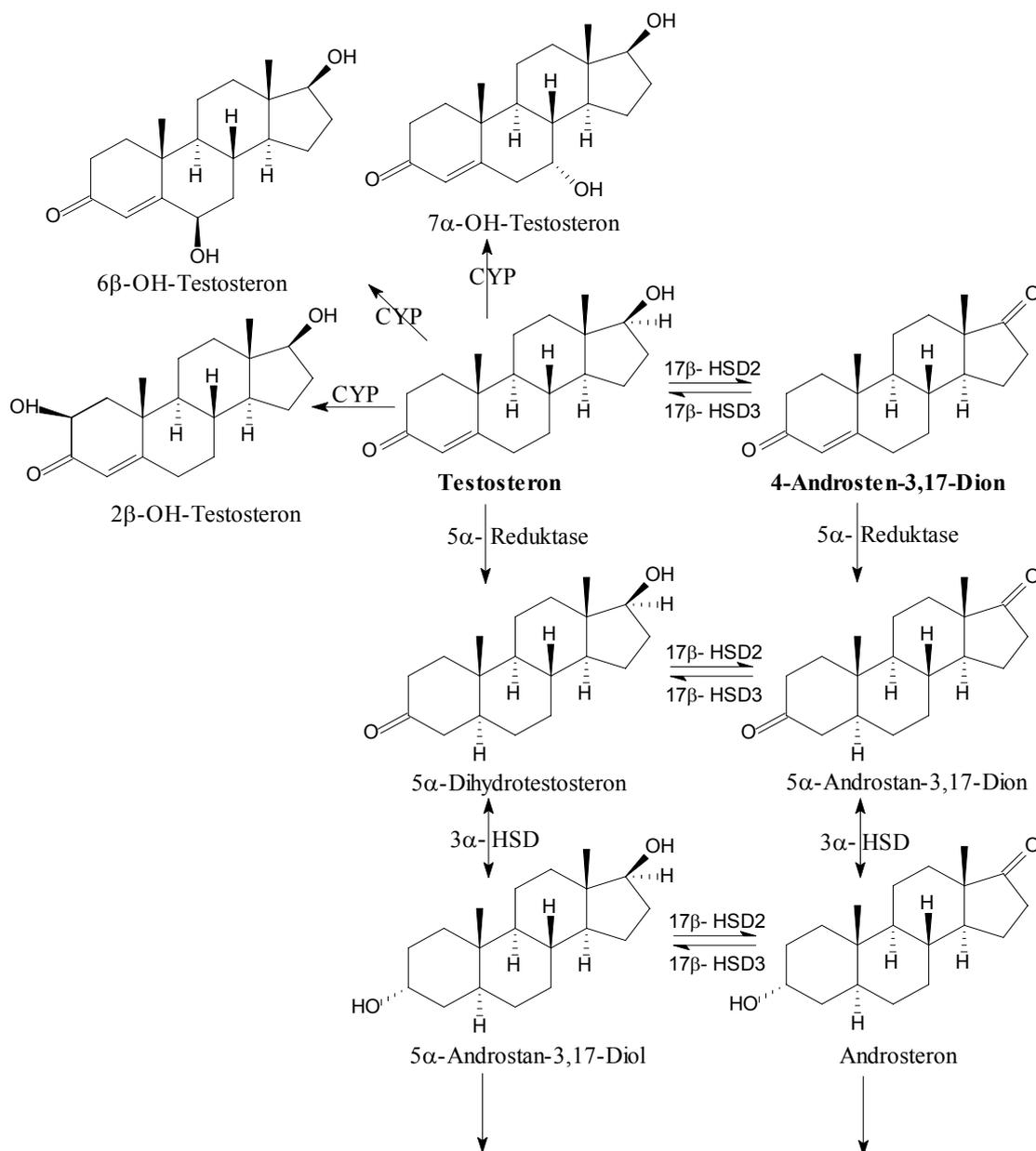
Dexa dieser Metabolit nachweisbar, so ergaben sich nach 48stündiger Testo- Inkubation in allen Proben Nachweise von 6 $\beta$ -OH-Testo. Innerhalb der Induktoren wirkte Rifampicin am stärksten induzierend auf die Andro- Bildung, insbesondere bei einer Testosteronumsetzung von nur 21h. Nach 48h lag Rifampicin deutlich unter der Medium- Kontrolle, auch die 6 $\beta$ -OH-Testo- Bildung wurde durch Rif nicht induziert. Dexamethason wirkte über 48h induzierend auf die Andro- Bildung, nach 69stündiger Induktion lag der Wert nur noch auf Kontrollniveau. Die 6 $\beta$ -OH-Testo- Bildung wurde durch Dexa unsignifikant induziert. PB zeigte erwartungsgemäß kaum induzierende Effekte. Durch 3-MC wurde die Andro- Bildung (48h Induktion) und besonders die Metabolisierung zu 6 $\beta$ -OH-Testo induziert. Allgemein lagen alle nach der Induktion erhaltenen Andro- Werte zwischen 2 und 20% der eingesetzten Testosteronausgangskonzentration, für 6 $\beta$ -OH-Testo waren es stets Werte unter 1%.

Die noch vorhandenen *Mengen an unverstoffwechseltem Testosteron* verdeutlichen nicht nur, dass die eingesetzte Menge Substrat ausrechend war, sondern auch, dass es sich bei der Reduktion von Testo zu Andro um eine umkehrbare Umsetzung handelt (siehe Abb. 5.3.39 – Testosteron- Metabolismus).

Sowohl die nach der Rifampicin als auch die nach der Dexamethason- Induktion noch vorhandene Menge Testo nahm mit zunehmender Induktionszeit und zusätzlich mit der Testosteron-Inkubationszeit ab. Beides ein Indiz dafür, dass diese Induktoren die Testosteron- Metabolisierung induzierten. Wie oben erwähnt, wirkte Rifampicin verstärkt auf die Androstendion-Bildung, während Dexa die CYP3A4- vermittelte Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testo forcierte. Nach 21-stündiger Testo- Inkubation lagen bei beiden Induktoren die noch vorhandenen Testo-Mengen im Bereich der Medium- Kontrolle, erst nach 48h Inkubation verringerten sich diese deutlich, wenngleich nicht signifikant. Durch PB blieb die Testosteron- Umsetzung unbeeinflusst. Auffällig erwies sich die Verwendung von 3-MC als Induktor. Die hier ermittelten Restmengen an Testo nach den Umsetzungen lagen signifikant über den Kontrollwerten, es wurden z.T. höhere Mengen Testo ( $\mu$ M) berechnet, als eingesetzt. Dies kann mit den Schwankungen, bedingt durch das Extraktionsverfahren, erklärt werden, besonders die ausgeprägten Standardabweichungen bestätigen dies.

Die Auswahl an INHIBITOREN fiel auf das CYP3A3/4/5- spezifische Triacetyloleandomycin (TAO)[39], das hauptsächlich für CYP2- Enzyme charakteristische Proadifen, für welches auch induzierende Wirkungen auf 3A- Enzyme beschrieben sind [93], und das  $\alpha$ -NP, einen spezifischen Inhibitor der CYP1A- Subfamilie, der CYP3- Enzyme unbeeinflusst ließ [39].

In Anlehnung an die vorangegangenen Untersuchungen wurde  $\alpha$ -NP in den Konzentrationen 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M eingesetzt, Proadifen wurde mit 125 $\mu$ M und 250 $\mu$ M getestet und für TAO waren es 50 $\mu$ M und 250 $\mu$ M. Da TAO (250 $\mu$ M) beginnende toxische Einflüsse zeigte (vgl. Abb. 5.2.33), wurde dies zusätzlich zum eigentlichen Assay ohne vorangehende Induktion den Zellen zugegeben. Alle anderen Inhibitor- Lösungen wurden ausschließlich nach vorheriger Induktion, unmittelbar vor Substratzugabe, den HaCaT- Zellen zugesetzt. In den Abbildungen 5.3.40 a) bis c) sind die Werte nach 72-stündiger Induktion und 48h Testo aus Abb. 5.3.38 noch einmal dargestellt, diesmal in Verbindung mit den Inhibitoren.

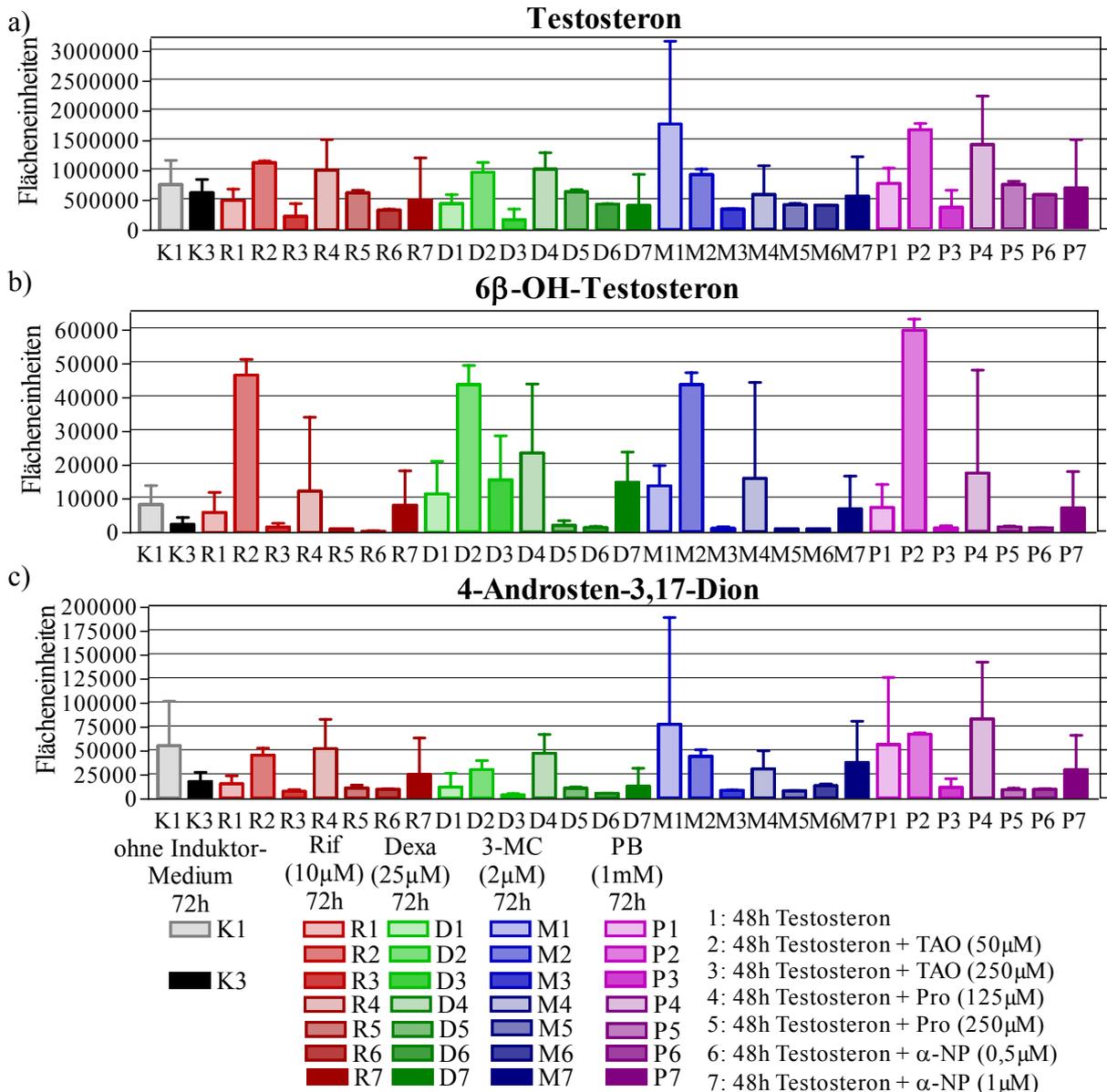


**Abb. 5.3.39:** Der periphere Androgen- Metabolismus, insbesondere des Testosterons (Darstellung modifiziert nach [137] und [62])

Die Hydroxylierungen im oberen Teil der Abbildung erfolgen Cytochrom- katalysiert, sie stellen nur einen Ausschnitt von vielen weiteren möglichen Hydroxylierungen dar. Die durch die 5α-Reduktase, die 17β-HSD und die 3α-HSD entstehenden Produkte können ebenfalls hydroxyliert werden. Die Pfeile verdeutlichen, welche Reaktionen umkehrbar sind und welche nicht.

Über die schon angesprochenen Kalibriergerade wurde ermittelt, dass die eingesetzte Menge Testo (250µM) ungefähr 1603000 FE entsprach. Daraus lässt sich anhand der Abb. 5.3.40 a) ableiten, dass, mit Ausnahme der 3-MC- Induktion und der Behandlung mit der Kombination aus PB und TAO (50µM), eine Verstoffwechslung des Testosterons durch HaCaT- Zellen stattgefunden hat. Auffallend war, dass sämtliche Werte für Rif, Dexa und PB nach TAO (50µM) und Proadifen (125µM) die reinen Induktionswerte überstiegen, bei 3-MC war es nur für 6β-OH-Testo der Fall. Dies war sowohl beim noch vorhandenen Testosteron, als auch bei der Bildung der Stoffwechselprodukte Andro und 6β-OH-Testo der Fall. Jedoch lagen die Werte für Andro im Bereich der Medium- Kontrolle, hingegen waren die reinen Induktions-

werte deutlich herabgesetzt. Dagegen waren die Werte für 6 $\beta$ -OH-Testo auch gegenüber der Medium- Kontrolle erhöht. Ein Anstieg der noch vorhandenen Testo- Menge über das Kontrollniveau (Medium) war nur nach PB ausgeprägt, für Rif und Dexa war dies nur in geringem Umfang zu beobachten und für 3-MC nahezu gar nicht.



**Abb. 5.3.40:** Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Zellen nach vorheriger Induktion für 72h sowie nachfolgender Inhibition (48h)

Versuchsbeginn bei gerade einsetzender Konfluenz. Endkonzentration Testo (250 $\mu$ M). Es sind die Mittelwerte von unterschiedlich vielen Experimenten dargestellt: für K1 (n=6); K3 (n=12); R1 (n=21); D1 (n=22); M1 (n=8); P1 (n=16); R/D/M/P-2;4;5;6 und 7 (n=4); R3 (n=5); D3 (=7); M3 (n=4); P3 (n=7).

a) nach der Umsetzung noch vorhandenes Testosteron

b) gebildete Menge 6 $\beta$ -OH-Testosteron

c) gebildete Menge 4-Androsten-3,17-Dion

TAO (250 $\mu$ M) verursachte allein bei Inkubation mit nicht induzierten Zellen eine deutliche Hemmung. Diese lag für 6 $\beta$ -OH-Testo etwa bei der Hälfte des Ausgangswertes, bei Andro war es nur noch ca. ein Drittel. Im Gegensatz wurde die Menge an noch vorhandenem Testosteron weniger herabgesetzt. Auch nach vorheriger Induktion führte die Verwendung von TAO (250 $\mu$ M) in nahezu allen Fällen zur Hemmung der Produktbildung. Da schon bei Ver-

suchsbeginn die Konfluenz einsetzte, lag bei Zugabe der Induktoren ein vollständig konfluenter Zellrasen vor, so dass lichtmikroskopisch keine Toxizität von TAO zu beobachten war, d.h. es handelte sich bei den ermittelten Werten um eine durch TAO (250 $\mu$ M) ausgelöste Inhibition. Jedoch nahm auch die Menge an Testo ab. Das bedeutet, wenn sowohl die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testo, als auch das durch Reduktion entstehende Andro und zudem das vorhandene Testo weniger wurden, konnten durch TAO (250 $\mu$ M) sowohl CYP3A-Enzyme als auch die 17 $\beta$ - Hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) gehemmt werden. Da Testo noch durch eine Vielzahl anderer Enzyme verstoffwechselt wird, welche offensichtlich durch TAO nicht gehemmt wurden, nahm in der Folge der Testosterongehalt ab. Diese weiteren Produkte der Metabolisierung konnten mit der angewandten Methodik nicht erfasst und charakterisiert werden. *Proadifen* (250 $\mu$ M) erwies sich als Inhibitor der Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testo und Andro gegenüber den nur induzierten Proben, wie auch gegenüber der Medium- Kontrolle, Testo blieb relativ unbeeinflusst. Auch hier konnte lichtmikroskopisch keine Schädigung der HaCaT- Zellen beobachtet werden, ein Toxizitätstest bei gleichem Versuchsdesign wurde nicht durchgeführt. Der Einsatz von  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) ergab ein ähnliches Bild, wie die Verwendung von Proadifen (250 $\mu$ M), lediglich einige Testo- Werte fielen etwas niedriger aus. Dagegen lagen alle Werte nach  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) über denen der geringeren Konzentration. Sie unterschieden sich für 6 $\beta$ -OH-Testo gar nicht und für Andro nur bei MC und PB von den rein induzierten Proben. Dies belegt, dass  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M), wie es zur Hemmung von CYP1- Enzymen eingesetzt wurde, zu keiner Inhibition der CYP3- Enzyme und der 17 $\beta$ -HSD führte.

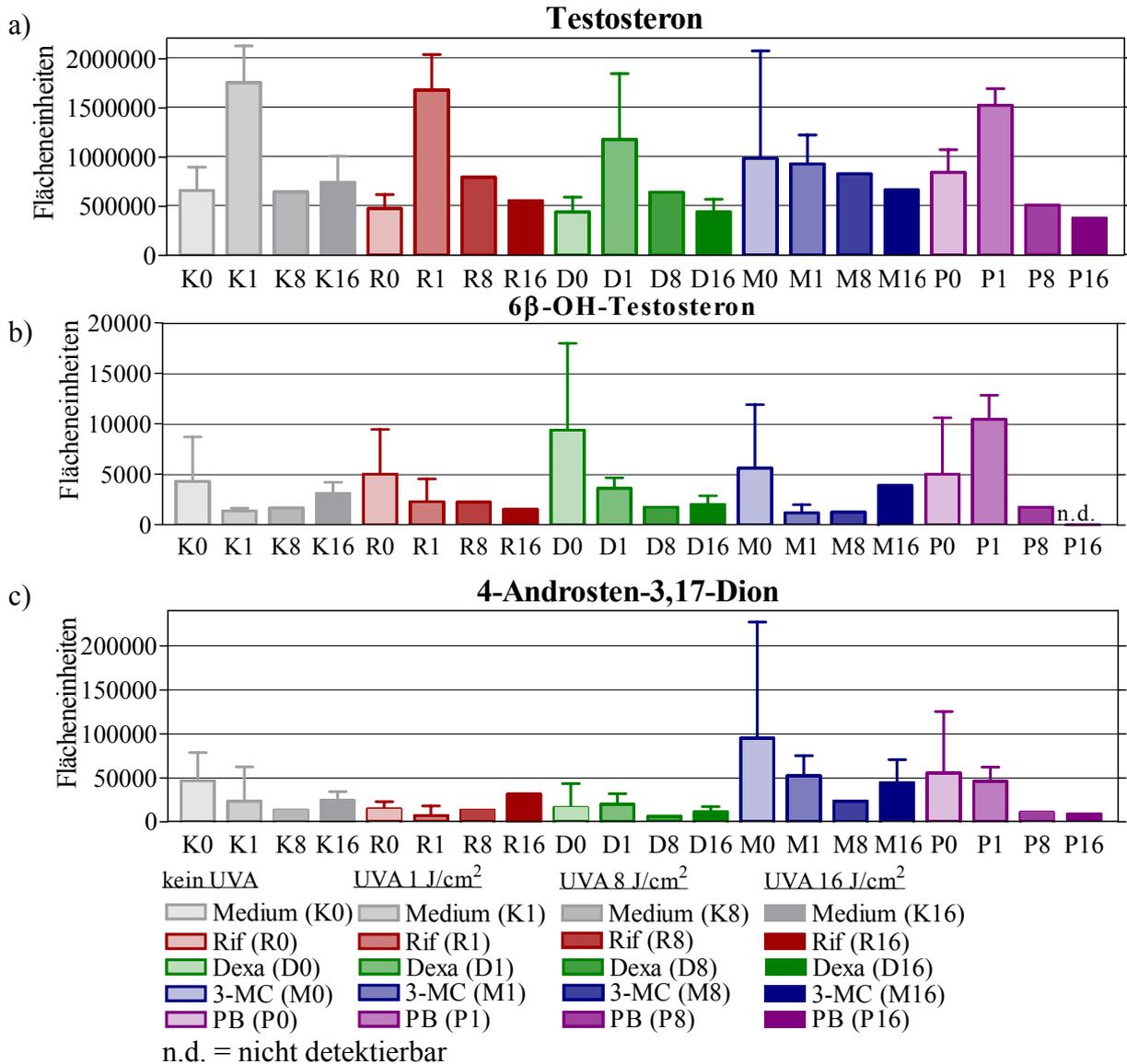
#### 5.3.3.4 Einfluss von UVA- Strahlung

Der Versuchsaufbau geschah angelehnt an den vorangegangenen Versuch. Grundsätzlich wurden die Endkonzentrationen der Lösungen beibehalten, ebenso die Induktions- und die Substratumsetzungszeit. Lediglich auf eine Untersuchung der Inhibitoren wurde hier verzichtet. Im Versuchsablauf gab es eine Ausnahme, vor der Zugabe der Induktoren wurden die HaCaT- Zellen mit einer UVA- Dosis von 1; 8 oder 16 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt und anschließend 24h in Medium inkubiert. Daraus resultierte sowohl für die Induktor- als auch die Substratzugabe ein 24h älterer Zellrasen. Um sich daraus ergebende mögliche Veränderungen auszuschließen, wurde zu jeder Bestrahlungsstufe eine Kontrolle mitgeführt, die zwar nicht bestrahlt wurde, in der aber in gleicher Weise der Medien austausch stattfand.

Die Abbildung 5.3.41 veranschaulicht, dass durch UVA- Bestrahlung von HaCaT- Zellen vor allem die CYP3A- vermittelte Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron abnahm. Eine Abhängigkeit von der Strahlendosis ließ sich nicht nachweisen. Lediglich die Kombination aus PB und UVA (1 J/cm<sup>2</sup>) führte zu einem Anstieg von 6 $\beta$ -OH-Testo gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Die mit Dexamethason induzierten, unbestrahlten Zellen zeigten eine Erhöhung der 6 $\beta$ -OH-Testo- Menge gegenüber uninduzierten HaCaT- Zellen, alle weiteren unbestrahlten Kontroll- Werte überschritten die Medium- Werte nicht.

Die Bildung von 4-Androsten-3,17-Dion fiel durch den Einsatz der vermeintlichen Induktoren Rif und Dexa unter das Kontrollniveau der unbestrahlten, Medium- behandelten Zellen, ganz

gleich, ob mit oder ohne UVA- Strahlung. Die Behandlung mit den Induktoren 3-MC und PB führte gegenüber Rif und Dexa teilweise zu höheren Androstendion- Werten, dennoch war auch hier keine deutliche Unterscheidung zu den unbestrahlten Medium- Kontrollwerten zu erkennen.



**Abb. 5.3.41:** Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten über 48h nach vorangegangener UVA- Bestrahlung und 72-stündiger Induktion

Versuchsbeginn bei gerade einsetzender Konfluenz. Endkonzentrationen: Rif (10 $\mu$ M); Dexa (25 $\mu$ M); 3-MC (2 $\mu$ M); PB (1mM); Testo (250 $\mu$ M). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, dabei wurden alle unbestrahlten Kontrollplatten gemittelt, es ergab sich n=18. Alle anderen Werte bestanden aus 8 bis 10 Experimenten; außer für UVA 8 J/cm<sup>2</sup>: n=4. Die Angabe  $\pm$  SD erfolgte nur, wenn n  $\geq$  6.

a) nach der Umsetzung noch vorhandenes Testosteron

b) gebildete Menge 6 $\beta$ -OH-Testosteron

c) gebildete Menge 4-Androsten-3,17-Dion

Für das nicht umgesetzte *Testosteron* ergaben sich andere Beobachtungen. Sowohl die Medium- Kontrolle, als auch die induzierten Proben, bis auf 3-MC, wiesen gegenüber unbestrahlten Kontrollzellen nach UVA (1 J/cm<sup>2</sup>) eine größere Menge Testo auf, mit umgerechneten Werten um die Ausgangskonzentration von 250 $\mu$ M. Da für alle anderen Kombinationen sämtliche Werte annähernd auf Kontrollniveau lagen, erscheint es wahrscheinlich, dass durch die UVA- Bestrahlung (1 J/cm<sup>2</sup>) die Gleichgewichte in den umkehrbaren Reaktionen der Testo-

steron- Umsetzung hin zum unverstoffwechselten Testosteron verschoben wurden (vgl. Abb. 5.3.39). Das bedeutet, die UVA- Dosis von  $1 \text{ J/cm}^2$  vermochte die  $17\beta$ -HSD 3 zu begünstigen. Dagegen führte der Einsatz von 3-Methylcholanthren sowohl ohne als auch mit geringer UVA- Strahlung zu einer verstärkten Induktion der  $17\beta$ -HSD 2 gegenüber der  $17\beta$ -HSD 3, wodurch die Bildung von Androstendion begünstigt war.

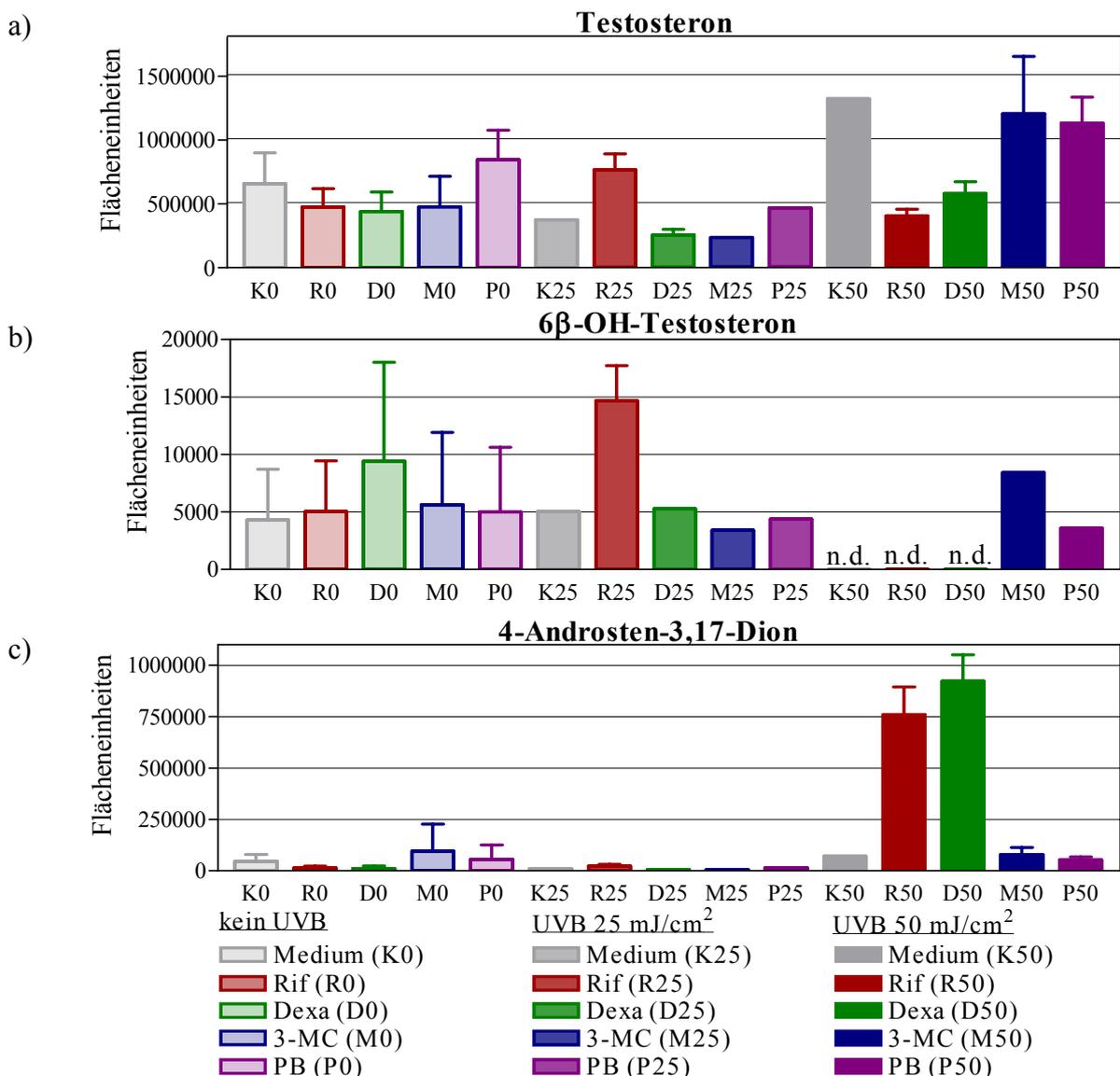
Eine Auffälligkeit konnte für alle Proben beobachtet werden. In den Versuchen mit UVA- Bestrahlung ( $8 \text{ J/cm}^2$ ) konnte nie für alle eingesetzten Proben die Bildung von Andro und/ oder  $6\beta$ -OH-Testo beobachtet werden. Meist gelang von acht eingesetzten Wells nur in vier Fällen der Nachweis eines der beiden Metabolisierungs- Produkte, obwohl die HaCaT- Zellen lichtmikroskopisch keine Schädigungen erkennen ließen. Ein ähnliches Verhalten war auch nach UVA  $16 \text{ J/cm}^2$  zu beobachten, allerdings konnte hier in sechs bis sieben Wells eine Produktbildung verzeichnet werden. Lediglich in der Kombination PB + UVA  $16 \text{ J/cm}^2$  wurde in keinem der Versuche  $6\beta$ -OH-Testo detektiert.

#### 5.3.3.5 Einfluss von UVB- Strahlung

Dieser Versuch wurde analog zur UVA- Bestrahlung durchgeführt. Als UVB- Dosen kamen  $25 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  zum Einsatz. Die Abb. 5.3.42 gibt die ermittelten Werte der Produktbildung  $6\beta$ -OH-Testo und Androstendion, sowie die noch vorhandene Menge Testosteron wieder. Bei der graphischen Darstellung wurde die x-Achse nicht nach Induktoren, wie in den vorangegangenen Abbildungen, sondern nach UVB- Strahlendosis sortiert, da dies die ermittelten Werte aussagekräftiger repräsentiert.

Wie schon in den vorherigen Versuchen ergaben die *unbestrahlten Kontrollen* eine Erhöhung der  $6\beta$ -OH-Testosteron- Menge nach Dexamethason (Dexa)- Induktion, die Werte unter Verwendung der anderen Induktoren blieben im Bereich der Medium- Kontrolle. Bei der Bildung von Androstendion lagen die Werte in der Gruppe ohne Bestrahlung nach Rifampicin (Rif) und Dexa- Behandlung unter den Medium- Kontrollniveau, nach 3-MC- Induktion waren sie gegenüber den Medium- Werten erhöht.

Nach der *UVB- Bestrahlung mit  $25 \text{ mJ/cm}^2$*  waren die noch vorhandenen Mengen an Testosteron gegenüber den unbestrahlten Proben, bis auf Rif, reduziert. Die Bildung von  $6\beta$ -OH-Testo lieferte Werte im Bereich der unbestrahlten Kontrolle, lediglich nach Rif- Induktion war eine Zunahme von  $6\beta$ -OH-Testo um das Dreifache, sowohl gegenüber der gleich bestrahlten Medium- Kontrolle, als auch gegenüber der gleich induzierten, unbestrahlten Probe zu verzeichnen. Die Androstendion- Bildung nach UVB ( $25 \text{ mJ/cm}^2$ ) ergab gegenüber dem unbestrahltem Versuch eine Erniedrigung für die Medium-, die 3-MC- und die PB- behandelten Proben, nach Rif und Dexa blieb sie unverändert.



n.d. = nicht detektierbar

**Abb. 5.3.42:** Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten über 48h nach vorangegangener UVB- Bestrahlung und 72-stündiger Induktion

Versuchsbeginn bei gerade einsetzender Konfluenz. Endkonzentrationen: Rif (10 $\mu$ M); Dexa (25 $\mu$ M); 3-MC (2 $\mu$ M); PB (1mM); Testo (250 $\mu$ M). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt, dabei wurden alle unbestrahlten Kontrollplatten gemittelt, es ergab sich n = 18; für UVB 25 mJ/cm<sup>2</sup> war n = 6, für UVB 50 mJ/cm<sup>2</sup> n = 10. Da nicht für jedes Experiment Werte ermittelbar waren, erfolgte die Angabe  $\pm$  SD nur, wenn n  $\geq$  6.

a) nach der Umsetzung noch vorhandenes Testosteron

b) gebildete Menge 6 $\beta$ -OH-Testosteron

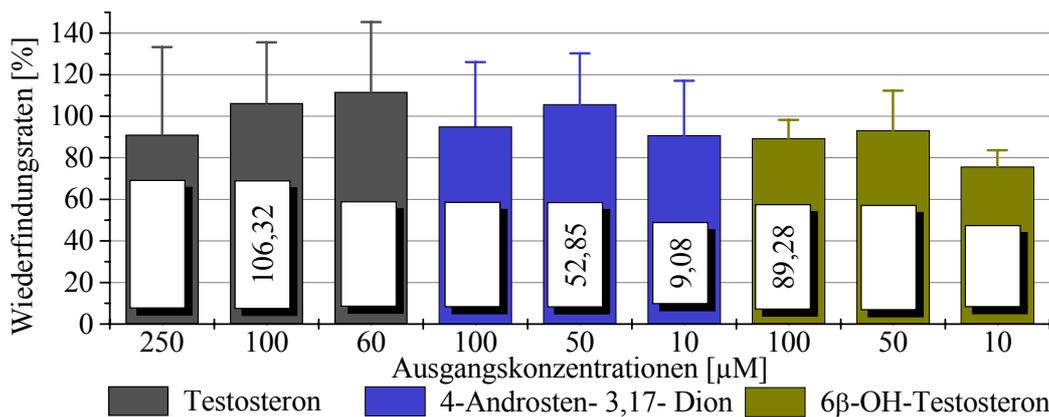
c) gebildete Menge 4-Androsten-3,17-Dion

Die Bestrahlung mit UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) führte zu Werten an unverstoffwechseltem Testosteron, die bei der Behandlung mit Medium, sowie nach 3-MC und PB- Behandlung, deutlich über denen der unbestrahlten, wie auch der 25 mJ/cm<sup>2</sup>- bestrahlten Proben lagen. Die Umrechnung per Kalibriergerade lieferte dabei Werte von ca. 75% der Ausgangsmenge. Nach Verwendung der Induktoren Rif und Dexa war die noch vorhandene Menge Testo dagegen auf ca. 30% der Ausgangsmenge gesunken. Eine Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testo ließ sich in Kombination mit UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) nur nach 3-MC und PB- Behandlung nachweisen. Die entsprechenden Mengen unterschieden sich kaum von denen der unbestrahlten, bzw. der mit 25 mJ/cm<sup>2</sup>- bestrahlten Proben. Während die Androstendion- Bildung nach Medium-, 3-MC- und

PB- Behandlung im Bereich der unbestrahlten Proben lag, lieferte der Einsatz der Induktoren Rifampicin und Dexamethason in Kombination mit UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) zehnfach erhöhte Androstendion- Werte, was Konzentrationen von  $135 \mu\text{M}$  bis  $165 \mu\text{M}$  entsprach. Nach dieser Bestrahlung bleibt festzustellen, dass sowohl für die Medium- Kontrollwerte als auch für die 3-MC und die PB- Behandlung das Gleichgewicht zwischen Testosteron und Androstendion auf der Seite von Testo lag, dagegen wurde durch den Einsatz von Rifampicin und Dexamethason dieses Gleichgewicht eindeutig hin zum Androstendion verschoben, was mit einer verstärkten Induktion der  $17\beta\text{-HSD 2}$  gegenüber der  $17\beta\text{-HSD 3}$  erklärt werden kann (vgl. Abb. 5.3.39).

#### 5.3.3.6 Ermittlung der Wiederfindungsraten nach Extraktion

Es wurden sowohl für Testosteron als auch für die beiden bei der Metabolisierung nachgewiesenen Produkte 4-Androsten-3,17-Dion und  $6\beta\text{-OH-Testosteron}$  die Wiederfindungsraten nach der Extraktion bestimmt. Wie im Kapitel 4.3.3.3 beschrieben, wurden Lösungen verschiedener Konzentration hergestellt, diese in gleicher Weise wie die Proben mit Diethylether extrahiert, und in Methanol aufgenommen, die Proben zur Vermessung per HPLC gebracht. Die nachfolgende Abb. 5.3.43 verdeutlicht die ermittelten Werte.



**Abb. 5.3.43:** Bestimmung der Wiederfindungsraten von Testosteron, Androstendion und  $6\beta\text{-OH-Testosteron}$

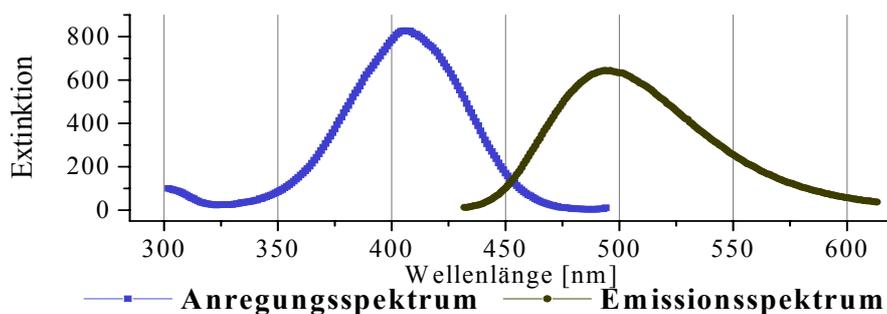
Es wurden Lösungen der drei Substanzen in Medium B in den angegebenen Konzentrationen hergestellt, je  $500 \mu\text{l}$  davon mit  $500 \mu\text{l}$  Diethylether extrahiert. Nach der Verdunstung des Ethers wurden die Proben in  $100 \mu\text{l}$  Methanol aufgenommen und anschließend per HPLC vermessen (Wasser/Methanol 40/60; Fluß  $1,0 \text{ ml/min}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 12$  Experimenten

Da die Wiederfindungsraten, insbesondere des, bei der CYP3A- vermittelten Verstoffwechslung entstehenden Metaboliten  $6\beta\text{-OH-Testosteron}$ , nicht befriedigend waren, wurde auf eine weitere Quantifizierung der Produkte durch Ermittlung der Proteingehalte verzichtet.

Es bleibt festzustellen, dass sämtliche gemachten Aussagen, vor allem die  $6\beta\text{-OH-Testosteron-}$  Bildung betreffend, nicht zur exakten Quantifizierung dienen, da alle Produktmengen dieses Metaboliten umgerechnet unter  $10 \mu\text{M}$  lagen. Ungeachtet dessen bleiben die bisherigen Aussagen prinzipiell gültig, sie sollten aber als tendenzielle Untersuchungsergebnisse angesehen werden, deren genaue Quantifizierung mit einer anderen Methodik in der Zukunft abgesichert werden sollte.

### 5.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB)

In Analogie zu den EROD und ECOD- Reaktionen wurde für das entstehende Produkt aus der Kupplungsreaktion von 4-(N,N-Dimethylamino)anilin an Fluorescamin mit Hilfe eines Fluoreszenz- Spektrophotometers ein Absorptions-/ Emissionsspektrum aufgezeichnet. Die Bedingungen entsprachen den Angaben in Kap. 4.3.4.1. Die Abb. 5.3.44 gibt diese Spektren wieder. Dementsprechend konnte in der Folge mit dem Exzitationsfilter 405 nm und dem Emissionsfilter 520 nm gearbeitet werden.

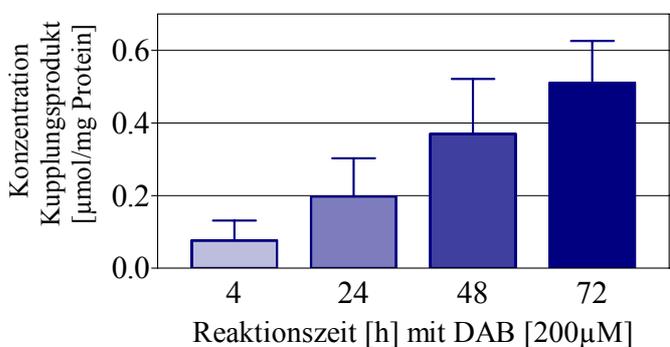


**Abb. 5.3.44:** Spektren des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin (1mM) und Fluorescamin (1,5mM)

Vor der Vermessung erfolgte eine 1:100 Verdünnung in Essigsäure- Natriumacetatpuffer (0,1M) pH 4,0.

#### 5.3.4.1 Bestimmung der Grundaktivität

In der Abbildung 5.3.45 ist die zeitliche Abhängigkeit des Grundumsatzes an DAB dargestellt. Es ergaben sich für jede untersuchte Zeit signifikant größere Produktmengen gegenüber der entsprechend vorherigen Zeit.



**Abb. 5.3.45:** Bildung des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin und Fluorescamin (1,5mM) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit DAB (200µM)

Konfluenz zu Versuchsbeginn 100%. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 80$  Experimenten mit, zu Versuchsbeginn, unterschiedlich alten HaCaT- Zellkulturen dargestellt. Nach einseitiger ANOVA und Bonferroni's multiplen Vergleichstest ergab sich  $p < 0,05$  für jede Zeit gegenüber allen anderen. (Weitere Werte unter [51].)

#### 5.3.4.2 Einsatz von Induktoren und Inhibitoren

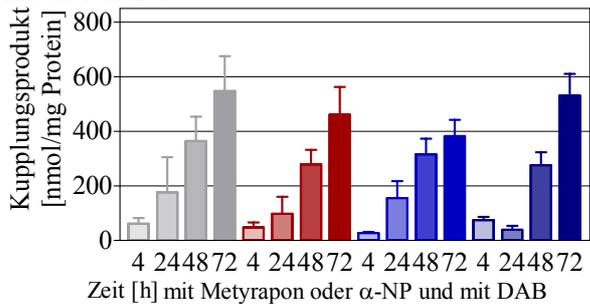
Um die ermittelte Basalaktivität der DAB- Umsetzung weiter zu charakterisieren, wurde als spezifischer CYP 4A- INDUKTOR *Clofibrat* (Clo) über unterschiedliche Zeiten getestet. Da für HaCaT- Zellen unter Kapitel 5.3.1 eine spezifische 3-MC-induzierbare CYP 1- Aktivität belegt werden konnte, wurde auch dieser Induktor auf seine Wirkung auf die DAB- Metabolisierung untersucht. Bereits im theoretischen Teil angesprochen (Kap. 3.5.3.4), kommen für die Umsetzung des DAB neben Reduktionsreaktionen auch oxidative Metabolisierungen per

N-Demethylierung, Ringhydroxylierung und N-Hydroxylierung in Betracht [132;171]. Wenn diese Reaktionen in nennenswertem Umfang eine Rolle spielen, dann sollte durch die 3-MC-Induktion dieser Metabolisierungsweg gegenüber den Reduktionen überwiegen, mit der Folge der verminderten Bildung von CYP 4A- vermitteltem Reduktionsprodukt 4-(N,N-Dimethylamino)anilin. Als mögliche INHIBITOREN wurden Metyrapon (Met) und  $\alpha$ -Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) untersucht.

Induktion: **Clofibrat (300 $\mu$ M)**

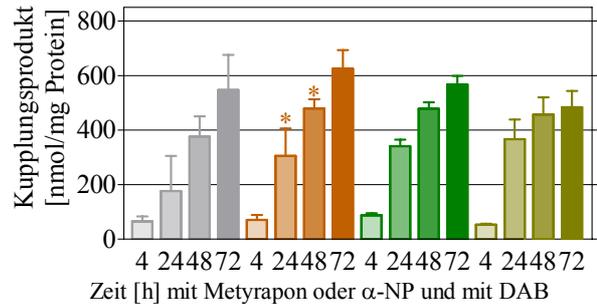
Induktionszeit:

**4h**



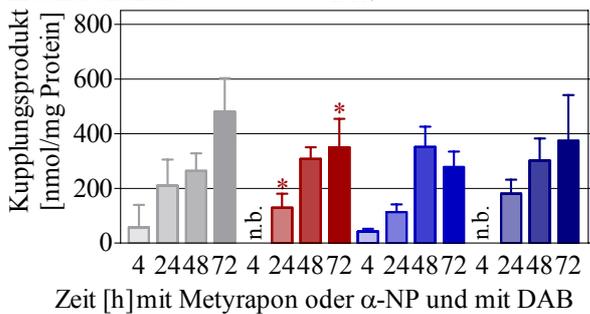
Induktion: **3-MC (2 $\mu$ M)**

**4h**

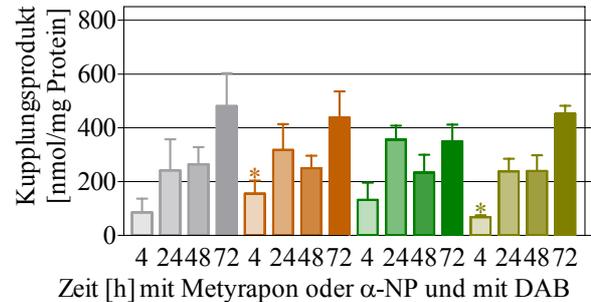


Induktionszeit:

**24h**

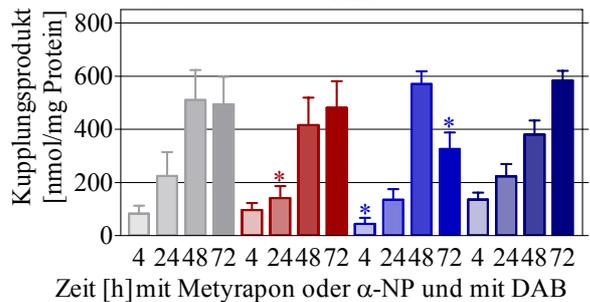


**24h**

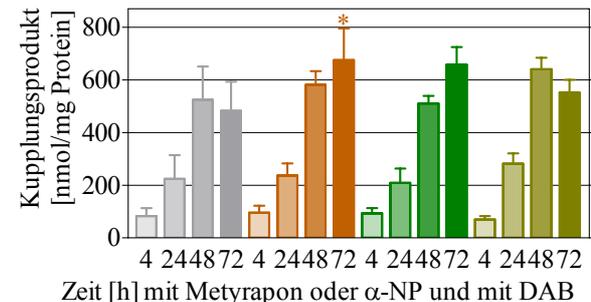


Induktionszeit:

**48h**

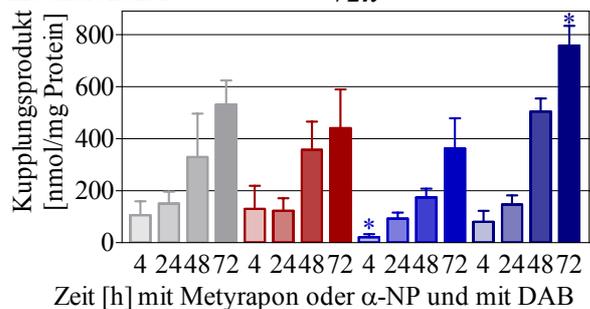


**48h**

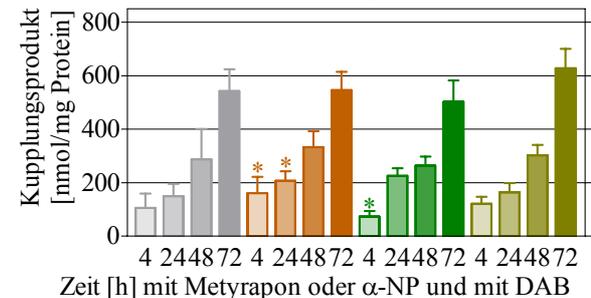


Induktionszeit:

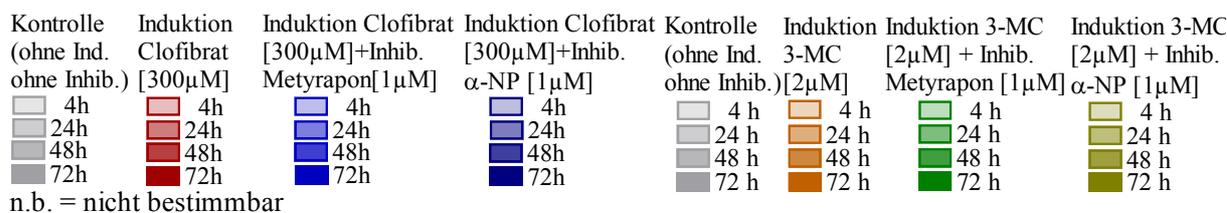
**72h**



**72h**



**Abb. 5.3.46:** Azoreduktion von DAB (200 $\mu$ M) an HaCaT- Zellen (Teil 1)



**Abb. 5.3.46:** Azoreduktion von DAB (200µM) an HaCaT- Zellen nach Induktion durch Clofibrat oder 3-MC, nachfolgend Hemmung durch Metyrapon oder α-NP (Erfassung des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin und Fluorescamin (Teil 2))

Konfluenz zu Versuchsbeginn 90%. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Experimenten dargestellt, außer: n = 20 (Kontrolle), n = 10 (Induktion). Nach einseitiger ANOVA und Bonferroni's multiplem Vergleichstest ergaben sich:

- \* p < 0,05 für Clofibrat gegenüber der unbehandelten, zeitgleichen Kontrolle
- \* p < 0,05 für Clofibrat + Metyrapon gegenüber Clofibrat der gleichen Zeit
- \* p < 0,05 für Clofibrat + α-Naphthoflavon gegenüber Clofibrat der gleichen Zeit
- \* p < 0,05 für 3-MC gegenüber der unbehandelten, zeitgleichen Kontrolle
- \* p < 0,05 für 3-MC + Metyrapon gegenüber 3-MC der gleichen Zeit
- \* p < 0,05 für 3-MC + α-Naphthoflavon gegenüber 3-MC der gleichen Zeit

(Daten zur Verfügung gestellt von Dietrich, A. - weitere Werte unter [51])

Wie die Abb. 5.3.46 zeigt, führte der Einsatz des Induktors Clofibrat zu keiner nennenswerten Erhöhung der Umsatzrate von DAB im Vergleich zu uninduzierten Zellen. Meist lagen die Mengen an Kupplungsprodukt nach Clofibrat- Behandlung sogar unter denen der Kontrollzellen, die nur in Medium inkubiert wurden. Die Verwendung des Induktors 3-MC ließ die Umsatzraten von DAB geringfügig ansteigen. Von den untersuchten 16 zeitlich verschiedenen Kombinationen erwies sich die Steigerung der Umsatzrate in 6 Fällen als signifikant. Weder eine bevorzugte Induktionszeit noch eine bestimmte Zeit mit dem Substrat DAB waren charakteristisch für die signifikanten Erhöhungen durch 3-MC. In ihrem Einfluss auf die Hemmung der durch Clofibrat oder 3-MC- induzierten Zellen unterschieden sich die beiden Inhibitoren Metyrapon und α-NP kaum. Beide blieben nahezu ohne inhibitorischen Effekt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reduktion von DAB mit zunehmender Inkubationszeit zunahm. Der CYP 4A spezifische Induktor Clofibrat brachte keine Steigerung der Umsatzrate. Die Werte nach 3-MC- Behandlung lagen über denen der mit Clofibrat umgesetzten Zellen, allerdings ergab auch die 3-MC- Induktion keine durchweg signifikante Erhöhung der DAB- Umsatzraten. Eine Verminderung der Kupplungsprodukt- Menge durch die potentiellen Inhibitoren Metyrapon und α- Naphthoflavon konnte nicht nachgewiesen werden. Damit ist für die Reduktion des DAB eine Beteiligung von CYP 4A- Enzymen unwahrscheinlich. Die Zunahme der DAB-Reduktion mit fortschreitender Zeit ohne Veränderung durch Induktoren und Inhibitoren kann auf die, in Kap. 3.5.3.4 angesprochenen, zytosolischen Reduktasen zurückzuführen sein.

Eine UVA- Bestrahlung mit 8 J/cm<sup>2</sup> bzw. eine UVB- Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> vor der Zugabe der Induktorlösungen analog zur Durchführung der EROD-, ECOD- und Testosteron- Bestrahlungsversuche (vgl. Kap. 4.3.1.3 d; 4.3.2.3 b; 4.3.3.2 c) ergab keine signifikante Veränderung der DAB- Reduktion gegenüber den Werten ohne Bestrahlung. (Daten nicht dargestellt)

## 6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu etablieren, das es ermöglicht, die Cytochrom P450- abhängigen Enzymaktivitäten in HaCaT- Keratinozyten näher zu charakterisieren. Anhand von so genannten Enzymvermittelten Indikatorreaktionen sollte die Aktivität einzelner Enzyme oder zumindest die Aktivität von speziellen Subfamilien beschrieben werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in der Charakterisierung der Subfamilie CYP1A/ 1B, des für den Arzneistoff- Metabolismus besonders relevanten Enzyms CYP 3A4 und der Subfamilie 4A. Es wurden als Indikatorreaktionen ausgewählt: 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD); 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD); Testosteron- Metabolisierung und 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB). Es wurden jeweils die Grundumsätze ermittelt und die Auswirkungen von verschiedenen Induktoren und Inhibitoren getestet. Mit Ausnahme der Reduktion erfolgte jeweils eine Untersuchung des Einflusses von UVA- oder UVB- Strahlung auf die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Zu Beginn der Untersuchungen sollte das Wachstumsverhalten der HaCaT- Zellen charakterisiert und optimale Bedingungen für die Zellkultur gefunden werden. Daran anschließend erfolgte die Etablierung von zwei Viabilitätstests. Es wurde mit dem Neutralrot (NR)- Test die schädigenden Auswirkungen auf Zellmembranen erfasst. Mit dem MTT- Test konnten Schädigungen in den Mitochondrien und damit für die Zelle schwerwiegendere Schädigungen bestimmt werden.

### 1) Viabilitätsassays

Die Zytotoxizitätstests der verwendeten Substanzen im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen dienten der Festlegung der Arbeitskonzentrationen aller Substanzen, die mit den HaCaT- Zellen inkubiert wurden. Es sollte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse zur Metabolisierung nicht, oder zumindest so wenig wie möglich, durch toxische Einflüsse überdeckt werden. Es wurde ermittelt, dass in allen Fällen die Toxizität, gekennzeichnet anhand der Herabsetzung der Lebensfähigkeit, umso deutlicher ausgeprägt war, je geringer die Konfluenz des Zellrasens bei Versuchsbeginn war. Das Arbeiten kurz vor bzw. bei einsetzender Konfluenz verringerte die Zytotoxizität deutlich. Nahezu alle Substanzen erwiesen sich in den Konzentrationen, in denen sie bei den enzymatischen Reaktionen zum Einsatz kamen, als untoxisch für HaCaT- Zellen. Kritisch zu betrachten bleibt die Verwendung von Proadifen. Sowohl mit der Zunahme der Konzentration als auch bei steigender Inkubationszeit nahm die Schädigung der Zellen zu, was im Lichtmikroskop gut zu beobachten war. Eine zunehmende Konfluenz des Zellrasens schwächte auch in diesem Fall die Toxizität ab. Der Einsatz von Proadifen (125µM) auf 80% konfluente HaCaT- Zellen über 24h führte bei der Untersuchung der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylaseaktivität (ECOD) zu keinen lichtmikroskopisch erkennbaren Schädigungen der Zellen, wenngleich eine Beeinträchtigung der Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden kann. In der selben Proadifen- Konzentration ergaben sich über 48h bei sonst gleichen Bedingungen im MTT- Test Lebensfähigkeitswerte unter 20%, wurde das Proadifen nur 50µM eingesetzt, waren die Schäden nicht signifikant.

Ebenso kritisch ist der Einsatz von Testosteron (250µM) zu sehen. Einerseits war diese Kon-

zentration nötig, um messbare Mengen an Testosteron- Metabolisierungsprodukten zu erhalten, andererseits führte sie bei halbkonfluenten HaCaT- Zellen über 53h zu einer Halbierung der Lebensfähigkeit im MTT- Test, wengleich der NR- Test mit 100%iger Konfluenz über 48h Lebensfähigkeitswerte über 80% lieferte.

In Kombination mit der UV- Bestrahlung waren die Toxizitätstests wichtig, um darzustellen, inwiefern die Ergebnisse ausschließlich den Metabolisierungsreaktionen zuzuordnen sind, oder ob eventuell toxische Effekte, ausgelöst durch die Strahlung, das metabolische Verhalten der Zellen beeinflussten.

## 2) Bestimmung der enzymatischen Aktivität von HaCaT- Keratinozyten

### A) 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die HaCaT- Keratinozyten zeigten eine *basale Deethylierung* von 7-Ethoxyresorufin (ER) zu Resorufin. Aufgrund der Spezifität dieser Modellreaktion ließ sich damit das Vorhandensein der CYP- Isoenzyme 1A1 und 1A2 belegen. Die gebildete Menge Resorufin nahm anfänglich mit der Zeit zu und blieb dann, bei einer Ausgangskonzentration von ER ( $2\mu\text{M}$ ), von 4 bis 72 Stunden konstant um  $660\text{ pmol/mg Protein}$ . Eine Erhöhung der ER- Konzentration wirkte mit steigender Konzentration bei gleichzeitig zunehmender Inkubationszeit toxisch auf die HaCaT- Zellen, wodurch weniger Resorufin gebildet wurde. Kürzere ER- Inkubationszeiten bis zu 5 Stunden führten bei steigenden ER- Konzentrationen zu einer vermehrten Produktbildung. Die Werte der Grundumsetzung mit der Literatur zu vergleichen gestaltete sich aufgrund der vielfachen Variationsmöglichkeiten zwischen den Assays schwierig. In einem Review über Keratinozyten- Zellen wurde dieses Problem bereits diskutiert [20].

Der Einsatz von 3- Methylcholanthren ergab eine deutliche *Induktion* von CYP 1A1/2 an HaCaT- Zellen. Die steigende Konzentration von 3-MC ( $0,5\mu\text{M}$ ;  $1\mu\text{M}$ ;  $2\mu\text{M}$ ) führte zu einer vermehrten Bildung von Resorufin. Für die einzelnen Konzentrationen ergaben sich maximale Induktionswerte nach 24- bis 28- stündiger Induktion, längere Inkubationszeiten mit 3-MC führten zu allmählich abnehmenden Resorufin- Mengen. Bei der 24- stündigen Induktion mit 3-MC konnten bei Einsatz von  $0,5\mu\text{M}$  3-MC die 1,7-fache Menge an Resorufin ( $\text{pmol/mg Protein}$ ) gegenüber dem Basallevel ermittelt werden, diese stieg mit 3-MC ( $1\mu\text{M}$ ) auf den Faktor 3 und erreichte mit Induktion durch 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ) eine knapp 4-fache Steigerung gegenüber dem Grundumsatz. Auch Delescluse et al. [48] erreichten mit dieser 3-MC- Konzentration eine 4-fache Erhöhung der EROD- Aktivität an HaCaT- Zellen, wengleich die sonstigen Assay- Bedingungen verschieden waren. Bei Einsatz von 3-MC an HaCaT- Zellen geringer Konfluenz und bei gleichzeitig kurzer Induktionszeit (7h) führten die niedrigeren 3-MC- Konzentrationen ( $0,5\mu\text{M}$ ;  $1\mu\text{M}$ ) zu einer größeren Steigerung der Resorufin- Menge gegenüber 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ), wie dies auch von Delescluse ermittelt wurde [48]. Gleichzeitig konnte bei Verwendung von unkonfluenten HaCaT- Zellen eine 6-fache Erhöhung der EROD- Aktivität nach Induktion durch 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ) bestimmt werden.

Die Verwendung von Phenobarbital führte zu keiner Steigerung der 7-Ethoxyresorufindeethylierungsrate. Die unter Phenobarbital- Einwirkung erhaltenen Mengen an Resorufin waren in

fast allen Versuchen geringer als die mit Medium behandelten Kontrollwerte. Eine Erklärung dafür konnte mit den Toxizitätstests von Phenobarbital nicht geliefert werden.

Eine *Hemmung* der durch 3-MC induzierten EROD- Aktivität konnte mit  $\alpha$ - Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) erreicht werden. Das Ausmaß der Inhibition war von der Stärke der vorherigen Induktion abhängig. Wurde mit 3-MC die Resorufin- Menge gegenüber der Kontrolle auf das 3-bis 4-fache erhöht, konnte durch  $\alpha$ -NP ( $1\mu\text{M}$ ) diese Menge auf das Kontrollniveau gesenkt werden. Fiel die Induktion geringer aus, ergaben sich nach der  $\alpha$ -NP- Behandlung Werte für Resorufin, die die Kontrollwerte unterschritten. Führte der Einsatz von 3-MC zu einer 5-fachen Induktion der Resorufin- Werte und darüber hinaus, reduzierte  $\alpha$ -NP ( $1\mu\text{M}$ ) die EROD- Aktivität zwar signifikant, konnte die Resorufin- Werte aber nicht vollständig auf das Kontrollniveau absenken.

Als weiterer möglicher Inhibitor der EROD- Aktivität wurde Proadifen eingesetzt. Aufgrund der starken Toxizität dieser Substanz war eine Auswertung für diese Modellreaktion nicht möglich.

Es wurde der Einfluss der *UVA*- Strahlendosen  $1\text{ J/cm}^2$ ;  $8\text{ J/cm}^2$  und  $16\text{ J/cm}^2$  untersucht. Weder innerhalb der verschiedenen Strahlendosen noch gegenüber den unbestrahlten Kontrollzellen kam es zu Veränderungen in der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase- Aktivität bis 72h nach der Bestrahlung. Die Induktion erfolgte dabei mit 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ) über 24h, die Inhibition mit  $\alpha$ -NP ( $1\mu\text{M}$ ) bei gleichzeitiger Einwirkung des Substrates 7-Ethoxyresorufin ( $2\mu\text{M}$ ) ebenfalls über 24h. Für die Induktionszeit von 48h mit 3-MC ( $2\mu\text{M}$ ), und damit 96h nach der Bestrahlung, wurde, bei sonst gleichen Bedingungen, eine mit der UVA- Dosis steigende EROD- Aktivität ermittelt. Besonders deutlich war dies in den mit Medium behandelten Kontrollzellen, deren Resorufin- Mengen lagen bis zu 1,5-fach höher als 72h nach der UVA- Bestrahlung. Die basale 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität nach Bestrahlung mit UVA ( $16\text{ J/cm}^2$ ) führte zu Resorufin- Mengen leicht über denen der unbestrahlten, aber 3-MC- induzierten Zellen. Die Werte der HaCaT- Zellen mit Induktor bzw. mit der Induktor-/Inhibitor- Kombination zeigten 96h nach der Bestrahlung ebenfalls eine tendenzielle Zunahme der EROD- Aktivität mit steigender Strahlendosis, allerdings lagen die Resorufin- Mengen nie höher, als die nach 72 Stunden erhaltenen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die durch 3-MC hervorgerufene Induktion der 7-Ethoxyresorufinumsetzung mit zunehmender Zeit und mit steigender UVA- Bestrahlung geringer wurde. In gleicher Weise fielen die Resorufin- Werte für die Behandlung mit 3-MC plus  $\alpha$ -NP niedriger aus. Ein MTT- Test nach der gesamten Umsetzung lies keine toxischen Effekte auf die HaCaT- Zellen erkennen.

Zur Untersuchung des Einflusses von *UVB*- Strahlung auf die CYP1A1/A2- vermittelte EROD konnten nur Versuche mit Strahlendosen von  $25\text{ mJ/cm}^2$  und  $50\text{ mJ/cm}^2$  zur Auswertung gebracht werden. Bei dem beabsichtigten Einsatz von UVB ( $100\text{ mJ/cm}^2$ ) verloren die Zellen die Haftung am Gefäßboden, was die Testung unmöglich machte.

Es ergaben sich große Unterschiede zwischen den beiden Strahlendosen. Wenngleich mit dem MTT- Test für UVB ( $50\text{ mJ/cm}^2$ ) bis 128 Stunden nach der Bestrahlung an mit Medium behandelten HaCaT- Zellen keine toxischen Effekte nachgewiesen werden konnten, fanden sich

bei Betrachtung der Zellen im Lichtmikroskop bereits 24h nach dieser Bestrahlung sichtbare Hinweise auf eine Schädigung der Zellen (Schrumpfung, Abrundung). Dies ist der anzunehmende Grund für die geringe 7-Ethoxyresorufin-Deethylierungsrate nach UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) 72h nach der Bestrahlung. Es fand sich in allen untersuchten Gruppen ein vergleichbares Bild, die Resorufin- Mengen der unbestrahlten Kontrolle und der mit UVB ( $25 \text{ mJ/cm}^2$ ) bestrahlten Proben waren nicht signifikant verschieden, dagegen erreichten die Resorufin- Werte nach UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) nur ein siebtel dieser Werte. Vergingen nach der Bestrahlung 96h (was bei den induzierten Zellen 48h Induktion entsprach), sanken die Resorufin- Werte mit Bestrahlung von 0 und  $25 \text{ mJ/cm}^2$  um durchschnittlich die Hälfte gegenüber den 72h-Werten. Im Gegensatz dazu stiegen die niedrigen Resorufin- Werte nach UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) auf das Doppelte an. Sie blieben zwar unter denen der geringeren UVB- Dosis, überschritten aber teilweise die unbestrahlten Kontrollen. Die HaCaT- Zellen waren entweder in der Lage, die durch die UVB- Bestrahlung hervorgerufene Schädigung zu reparieren oder durch das Wachstum neuer Zellen auszugleichen. In der Folge konnte für UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) mit zunehmender Zeit nach der Bestrahlung eine Zunahme der EROD- Aktivität beobachtet werden.

Der Einsatz von Phenobarbital führte auch in Kombination mit UVB- Bestrahlung nicht zu einer Induktion der EROD- Aktivität.

Die Veränderung der Protein- Mengen in HaCaT- Zellen nach 7- Ethoxyresorufin in Kombination mit UV- Bestrahlung wird nachfolgend unter 3) Weitere Aspekte erläutert.

#### B) 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Die HaCaT- Keratinozyten zeigten eine *basale Deethylierung* von 7-Ethoxycoumarin (EC) zu 7-Hydroxycoumarin (7-HC; häufig auch als Umbelliferon bezeichnet). Anders als bei der vorherigen Modellreaktion konnte das Deethylierungsprodukt 7-HC nur nach vorangegangener Deglucuronidierung/- sulfatierung zuverlässig bestimmt werden. Dies belegt das Ablaufen von Phase-II-Reaktionen in HaCaT- Zellen. Es wurde keine Zeitabhängigkeit der Umsetzung untersucht, die Reaktionen mit EC erfolgten über 24 Stunden. Ausgangskonzentrationen von  $100 \mu\text{M}$ ;  $250 \mu\text{M}$  und  $500 \mu\text{M}$  EC führten zu 7-Hydroxycoumarin-Werten von 1080; 1075 bzw.  $840 \text{ pmol/mg}$  Protein an HaCaT- Zellen von 80%iger Konfluenz. Ein völlig konfluenten Zellrasen lieferte bei gleicher Inkubationszeit und gleichen EC-Konzentrationen 2090; 1585 und  $660 \text{ pmol/mg}$  Protein 7-Hydroxycoumarin. Die Erhöhung der EC- Konzentration wirkte zunehmend toxisch auf die HaCaT- Zellen, wodurch weniger Hydroxycoumarin gebildet wurde. Eine *Induktion* der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung konnte durch 3-Methylcholanthren erzielt werden, Phenobarbital zeigte keinen induktiven Effekt. Bei der Umsetzung von EC ( $250 \mu\text{M}$ ) an noch nicht konfluenten HaCaT- Zellen wurde durch 24-stündige Induktion mit 3-MC ( $5 \mu\text{M}$ ) eine Erhöhung der 7-HC- Menge um das 25-fache erreicht, mit 3-MC ( $2 \mu\text{M}$ ) lag die HC- Menge mit über  $8000 \text{ pmol/mg}$  Protein 13-fach über den mit Medium behandelten Kontrollwerten. Wurde die gleiche Untersuchung an konfluenten Zellen durchgeführt, so ergab sich eine durchschnittliche Erhöhung um das 5-fache. Die Untersuchung unterschiedlicher EC- Konzentrationen im Anschluss an eine 24-stündige 3-MC ( $2 \mu\text{M}$ )- Induktion führte für EC ( $100 \mu\text{M}$ ) zu einer 4,5- fachen, für EC ( $250 \mu\text{M}$ ) zur 5-fachen Erhöhung der 7-HC-

Werte. Aufgrund der zunehmenden toxischen Einflüsse von EC (500 $\mu$ M) fielen die 7-HC-Mengen verglichen mit EC (100 $\mu$ M; 250 $\mu$ M) in den Medium- behandelten Kontrollgruppen geringer aus. Dagegen wurden bei den Induktionsversuchen diese toxischen Einflüsse von EC (500 $\mu$ M) nicht deutlich, die 7-HC- Werte stiegen mit zunehmender EC- Konzentration. So ergaben sich nach 3-MC-Induktion und nachfolgender Umsetzung mit EC (500 $\mu$ M) über 24h Schwankungen von 7- bis 13-fach über Kontrollniveau.

Ein Vergleich zur 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung zeigt, dass der durch 24-stündige Induktion mit 3-MC (2 $\mu$ M) und anschließender Substratumsetzung (24h) erzielte Zuwachs für die ECOD etwas höher ausfiel (5-fach gegenüber 4-fach), was die Angaben in der Literatur bestätigt, dass an der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung Cytochrom-P450-Isoenzyme aus verschiedenen Enzymfamilien beteiligt sind, während die EROD charakteristisch für Enzyme der Subfamilien CYP1A/1B- ist [93].

Eine *Hemmung* der durch 3-MC induzierten ECOD- Aktivität konnte mit  $\alpha$ - Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) erreicht werden. Da sich bei den vorangegangenen MTT- Toxizitätstests eine Abnahme der Lebensfähigkeit der HaCaT- Zellen bei steigender EC und  $\alpha$ -NP- Konzentration ergab (vgl. Kapitel 5.2.2.1), wurde zur Untersuchung zunächst nur  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) eingesetzt. Dies reduzierte die 7-HC- Menge an unkonfluenten HaCaT- Zellen nach vorheriger 3-MC-Induktion (2 $\mu$ M; 24h) um den Faktor 1,6, blieb damit noch 8-fach über den Medium- Kontrollwerten. Der Einsatz von  $\alpha$ -NP (2,5 $\mu$ M) senkte die 7-HC- Menge nach 3-MC-Induktion deutlich, allerdings wurde auch mit dieser Konzentration das Kontrollniveau nicht ganz erreicht. Bei einem sonst identischen Versuch an konfluenten Zellen, wurden mit  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) die 7-HC- Werte nach 3-MC-Induktion auf das Kontrolllevel gesenkt, mit  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) gelang dies wiederum nicht. Entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Inhibition hatte nicht nur die Konzentration des Inhibitors, sondern auch die Konfluenz des Zellrasens. Geringe Konfluenz bedeutete, dass die Inkubation mit 3-MC auf sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche HaCaT- Zellen so stark induzierend wirkte, dass selbst mit der hohen Konzentration von  $\alpha$ -NP (2,5 $\mu$ M) diese Induktion nicht komplett gehemmt werden konnte. An konfluenten Zellen fiel die 3-MC-Induktion weniger stark aus, so dass mit  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) eine vollständige Hemmung möglich war.

Ein ganz anderes Bild ergab sich nach dem Einsatz von Proadifen. Die Inkubation mit Proadifen (50 $\mu$ M) anschließend an die 3-MC- Induktion erhöhte die 7-HC-Werte weiter um das 1,3-fache. Wurde Proadifen (125 $\mu$ M) verwendet, konnte eine Inhibition der 7-HC- Werte um den Faktor 2,6 beobachtet werden. Dass Proadifen kein reiner Inhibitor ist, sondern auch induktive Effekte zeigt, wurde bereits in der Literatur beschrieben [13-15;189]. Der Einsatz von Proadifen (125 $\mu$ M) bezüglich der Toxizität gegenüber HaCaT- Zellen wurde bereits diskutiert.

Es wurde der Einfluss der *UVA*- Strahlendosen 1 J/cm<sup>2</sup>; 8 J/cm<sup>2</sup> und 16 J/cm<sup>2</sup> nach unterschiedlichen 3-MC-Induktionszeiten auf die ECOD untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation mit 3-MC und somit 72h nach der Bestrahlung lies sich für alle Bestrahlungsstufen die Induktion um das 2-3-fache belegen, die durch Inhibition mit  $\alpha$ -NP (1 $\mu$ M) auf Kontrollniveau ge-

hemmt wurde. Dabei ergab sich für die Bestrahlung mit  $1 \text{ J/cm}^2$  die geringsten Werte, welche mit zunehmender Bestrahlungsintensität stiegen, aber die unbestrahlten Kontrollwerte nicht überschritten. Längere Zeiten mit 3-MC und somit insgesamt 96h bis 120h nach der Bestrahlung waren nur noch schwache induktive Effekte des 3-MC zu verzeichnen, es zeigte sich die Tendenz, dass bei den induzierten Proben mit zunehmender UVA- Dosis die 7-HC- Werte stiegen, dagegen nahmen sie in der Medium- Kontrollgruppe mit steigender UVA- Dosis ab. In der Gruppe der mit 3-MC- induzierten und nachfolgend  $\alpha$ -NP- gehemmten Zellen war keine eindeutige Beeinflussung aufgrund der UVA- Strahlung ersichtlich.

Zur Untersuchung des Einflusses von UVB- Strahlung auf die ECOD kamen wieder die Strahlendosen von  $25 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  zum Einsatz. Es wurde deutlich, dass mit zunehmender UVB- Dosis die induktive Kapazität der HaCaT- Zellen auf die ECOD abnahm. In gleichem Maß fielen die 7-HC-Werte nach 3-MC- Induktion und nachfolgender  $\alpha$ -NP- Hemmung geringer aus. Im Gegensatz dazu blieben die 7-HC-Werte des Kontrolllevels konstant, ganz gleich, wie intensiv die UVB- Bestrahlung war. Die Verwendung verschiedener EC- Konzentrationen führte zu keinerlei bestrahlungsabhängigen Veränderungen. Bestrahlungsversuche an noch nicht konfluenten Zellen, bei identischem Versuchsdesign zur Induktion, führten zwar zu höheren 7-HC- Werten nach 3-MC- Induktion, es blieb aber dabei, dass mit steigender UVB- Dosis die Menge an 7-Hydroxycoumarin, gebildet in HaCaT- Zellen nach Induktion mit 3-MC, rückläufig war.

### C) Testosteron- Metabolisierung

Der basale Nachweis des CYP3A-Metaboliten *6 $\beta$ -OH-Testosteron* war nur nach Einsatz von Testosteron ( $250 \mu\text{M}$ ) möglich, geringere Konzentrationen führten in dem Untersuchungszeitraum bis 96 Stunden nicht zu einer Bildung von *6 $\beta$ -OH-Testosteron*. Zur Produktbildung von *6 $\beta$ -OH-Testosteron* wurde auch eine gewisse Inkubationszeit mit dem Substrat benötigt. Nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron konnte nur unter Einsatz des Induktors Dexamethason die Bildung von *6 $\beta$ -OH-Testo* ermittelt werden, nach 48-stündiger Inkubation war dies in allen untersuchten Fällen, so auch der Medium- Kontrolle möglich. Noch längere Inkubationszeiten mit Testosteron (96h) führten zu keiner Produktbildung an *6 $\beta$ -OH-Testosteron*, vermutlich überwog die Toxizität des Testosterons auf die HaCaT- Zellen.

Die Bildung von *4-Androsten-3,17-Dion* (Andro) geschah im Vergleich zur Bildung von *6 $\beta$ -OH-Testosteron* recht schnell, so konnte nach 4-stündiger Testosteroninkubation ( $250 \mu\text{M}$ ) bereits die Bildung von Andro nachgewiesen werden.

Eine signifikante *Induktion* der CYP 3A- vermittelten Bildung von *6 $\beta$ -OH-Testosteron* war durch keinen Induktor zu beobachten, lediglich Dexamethason schien gegenüber den anderen Induktoren etwas überlegen zu sein. Als einziger Induktor begünstigte 3-MC die Umsetzung zu Androstendion. Die Androstendion- Bildung ergab für die Induktoren nach 21-stündiger Testosteron- Inkubation höhere Werte, als nach 48-stündiger Testosteron- Umsetzung. Unterschiedliche Induktionszeiten von 48 und 69h hatten keinerlei Einfluss auf diese Bildung.

Der Einsatz der eigentlichen *Inhibitoren* TAO ( $50 \mu\text{M}$ ) und Proadifen ( $125 \mu\text{M}$ ) zeigte eine

weit über das Kontrollniveau und die reinen Induktionswerte hinausgehende Erhöhung an 6 $\beta$ -OH-Testosteron. Eine wirkliche Inhibition, sowohl gegenüber den mit Medium behandelten Zellen, als auch gegenüber induzierten Zellen, konnte durch Einsatz von TAO (250 $\mu$ M), Proadifen (250 $\mu$ M) und  $\alpha$ -NP (0,5 $\mu$ M) beobachtet werden. Obwohl es sich dabei teilweise um hohe Konzentrationen der Substanzen handelte, konnten lichtmikroskopisch keine Schädigungen der HaCaT- Zellen beobachtet werden, ein Toxizitätstest hierzu wurde nicht durchgeführt. Die in den Versuchen zur Charakterisierung der CYP1-Enzyme eingesetzte Konzentration des  $\alpha$ -NP von 1 $\mu$ M führte bei der Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron in keinem Fall zu einer Verminderung der Produktmenge, lediglich die nach 3-MC und PB- Induktion erhaltenen, sehr hohen Andro- Werte wurden herabgesetzt.

Dass neben den beiden charakterisierten Produkten der Testosteron- Metabolisierung zum Teil auch die Menge des noch vorhandenen Testosterons unter der Verwendung der Inhibitoren abnahm, lässt sich mit dem Vorhandensein weiterer, an der Umsetzung beteiligter Enzyme begründen. Diese blieben offenbar durch die eingesetzten Inhibitoren unbeeinflusst. Somit schritt die Testosteron- Metabolisierung fort. Weitere, bei der Metabolisierung möglicherweise entstehende Produkte wurden mit der angewandten Methodik nicht erfasst.

Die UVA- Strahlung reduzierte die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Lediglich die Kombination aus PB- Induktion und UVA (1 J/cm<sup>2</sup>) zeigte eine vermehrte Bildung des CYP3A- Metaboliten in HaCaT- Zellen. Bei höheren Strahlendosen verringerte sich die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron in Kombination mit PB- Induktion, so dass nach UVA 16 J/cm<sup>2</sup> keine Produktbildung messbar war.

Die UVA- Strahlung beeinflusste die Bildung von Androstendion in den Medium- behandelten Kontrollzellen, als auch nach Rifampicin- und Dexamethason- induzierten Proben nicht. Dagegen ließ die Kombination aus 3-MC/ UVA als auch PB/ UVA zum Teil eine leichte Erhöhung der Androstendion- Bildung gegenüber der Medium- Kontrolle erkennen.

Die noch vorhandene Menge Testosteron nach der Umsetzung lag in nahezu allen Fällen auf Kontrollniveau, lediglich alle mit UVA 1 J/cm<sup>2</sup> behandelten Zellen (mit Ausnahme der 3-MC- induzierten) wiesen sehr hohe Mengen Testosteron auf. Umgerechnet beliefen sich die Konzentrationen annähernd auf die Ausgangswerte von 250 $\mu$ M Testosteron. Durch eine schwache UVA- Dosis von 1 J/cm<sup>2</sup> war es somit offenbar möglich, die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 3 (17 $\beta$ -HSD 3) gegenüber der 17 $\beta$ -HSD 2 zu induzieren, was die vermehrte Bildung von Testosteron zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu schien eine 3-Methylcholanthren- Behandlung zu dem gegenteiligen Effekt zu führen, was mit der vermehrten Bildung von Androstendion einherging. Das Verhalten von 17 $\beta$ -HSD 2/3 wurde in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert. Eine Abhängigkeit der Bildung an Metabolisierungsprodukten von der UVA- Dosis ergab sich nur bei Verwendung von Phenobarbital als Induktor, sonst erschienen die Effekte eher heterogen.

Die UVB- Bestrahlung mit 25 mJ/cm<sup>2</sup> führte nach Rifampicin- Induktion zu einer dreifachen Erhöhung der 6 $\beta$ -OH-Testosteron- Menge gegenüber der unbestrahlten Medium- Kontrolle.

Alle anderen Werte lagen nach dieser Bestrahlung im Bereich des Medium- Kontrollniveaus. Die Bildung von Androstendion blieb nach  $25 \text{ mJ/cm}^2$  UVB unbeeinflusst. Die höhere UVB-Dosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  führte hauptsächlich zu einer Beeinflussung der  $17\beta$ -HSD 2/3 mit deutlichen Unterschieden in Abhängigkeit von den potentiellen Induktoren bzw. Medium. Während die Verwendung von Medium, 3-MC und PB die  $17\beta$ -HSD 3 begünstigte, mit der Verschiebung des Testosteron- Androstendion- Gleichgewichtes hin zum Testosteron, führte die Verwendung von Rifampicin und Dexamethason bei dieser Strahlendosis zur Induktion der  $17\beta$ -HSD 2 gegenüber der  $17\beta$ -HSD 3, in deren Folge die Androstendion- Menge gegenüber allen anderen Werten um ca. das Zehnfache stieg. Sowohl nach Rifampicin, als auch nach Dexamethason- und Medium- Behandlung in Kombination mit UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) konnte keine CYP3A- spezifische Bildung von  $6\beta$ -OH-Testosteron ermittelt werden, was zumindest in den beiden ersten Fällen auf eine vermutlich sehr schnelle Umsetzung des Testosteron zu Androstendion zurückzuführen war, in deren Folge nicht genügend Substrat zur Bildung von  $6\beta$ -OH-Testosteron zur Verfügung stand. Der Einsatz von 3-MC und PB, bei dem genügend unverstoffwechseltes Testosteron vorhanden war, lieferte  $6\beta$ -OH-Testosteron- Werte, die sich in dem Bereich der unbestrahlten Kontrolle bewegten. Dass die Medium- Kontrolle hierbei keine Detektion von  $6\beta$ -OH-Testosteron zuließ, könnte an einer erhöhten Toxizität liegen. Möglich ist auch ein Metabolisierungsweg des Testosterons, der in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde.

Die *Wiederfindungsraten*, besonders die für den CYP3A- Metaboliten  $6\beta$ -OH-Testosteron, waren mit unter 80% für Konzentrationen bis  $10\mu\text{M}$  nicht befriedigend. Da in keiner Untersuchung größere Mengen dieses Produktes ermittelt wurden, sollten alle bisher gemachten Aussagen, die  $6\beta$ -OH-Testosteron betreffen, nur als Tendenz verstanden werden. Eine exaktere Quantifizierung war mit der angewandten Methodik somit nicht zu realisieren. Aufgrund der nicht befriedigenden Wiederfindungsraten bei der Metabolisierung von Testosteron wurde auf die Ermittlung des Proteingehaltes verzichtet.

#### D) 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzol-Reduktion (DAB)

Mit zunehmender Substrat- Inkubationszeit stiegen die Umsatzraten von DAB nahezu linear. Der CYP 4A- spezifische *Induktor* Clofibrat führte zu keiner Zunahme der Mengen an Kupplungsprodukt gegenüber unbehandelten HaCaT- Zellen. Im Gegenteil, die Zellen unter Clofibrat- Behandlung lieferten geringere Werte gegenüber der Kontrolle. Durch den Einsatz von 3-MC stiegen die Mengen Kupplungsprodukt leicht an. Eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollzellen ließ sich aber nur in wenigen Fällen ermitteln. Die beiden *Inhibitoren* Metyrapon und  $\alpha$ -NP blieben ohne wesentlichen Einfluss auf die DAB- Umsatzraten sowohl nach Clofibrat als auch nach 3-MC- Induktion.

Somit konnte für HaCaT- Keratinozyten keine durch DAB-charakterisierbare CYP 4A-Reduktase- Aktivität nachgewiesen werden. Es wurde auf die Darstellung der UV- Bestrahlung verzichtet und Veränderungen in den Proteinmengen nicht ausführlich charakterisiert.

### 3) Weitere Aspekte

#### a) Produktmenge und Proteingehalt

Von den meisten Autoren wird vorausgesetzt, dass zu Beginn der Umsetzung die Produktbildung linear verläuft, weshalb die Bestimmung der Produktmengen, ganz gleich bei welcher Modellreaktion, häufig nur bis 6 Stunden verfolgt wurde. In vielen Studien wurde auch mit Zellhomogenaten gearbeitet, was die zeitliche Verwendbarkeit zusätzlich einschränkte. In der vorliegenden Arbeit wurde mit intakten Zellen gearbeitet, so war es möglich, metabolische Effekte auch nach 24 und 48 Stunden nachzuweisen, zum Teil fanden die Untersuchungen nach noch längerer Inkubationszeit statt. Dabei ergab sich ein Problem, das am Beispiel der EROD im Kapitel 5.3.1.1 aufgezeigt wurde. Die genannte Linearität in der Zunahme der Resorufin-Menge, ausgedrückt in pmol/ml, galt nur für einen sehr kurzen Zeitraum. Hinzu kam, dass die Zunahme der Proteinmenge einen wesentlich steileren Verlauf nahm. Dadurch ergab sich in der üblichen Darstellung von Produktmenge je mg Protein ein Maximum. Für die 7-Ethoxyresorufindeethylase-Bestimmung lag dieses Maximum bei ca. 24 Stunden. Aus diesem Grund wurden für die Aussagen zur metabolischen Aktivität feste Zeitpunkte der Substratumsetzung gewählt, um die Versuche untereinander vergleichen zu können. Ausgewählt wurden die Zeitpunkte 24h; 48h gegebenenfalls 72h und 96h, eher selten wurde die Substratumsetzung schon nach 12h beendet.

Vermutungen, dass die Verwendung von Induktoren auch zu einem Zuwachs an Protein führt, konnten weder für die EROD noch die ECOD belegt werden. Neben den enzymatischen Reaktion wurde meist der Proteingehalt bei Versuchsende zusätzlich dargestellt, um dessen Einfluss und Bedeutung für die gesamte Umsetzung aufzuzeigen.

#### b) UV- Bestrahlung

Die Verwendung der Bestrahlungskammer ließ einen maximalen Abstand zwischen den Leuchtstoffröhren und den Zellproben von 18cm zu. Wenngleich diese Kammer schon häufig benutzt wurde [72;144;158], so jedoch zu anderen Problemstellungen als in der vorliegenden Arbeit. In der Literatur erfolgte von den meisten Autoren keine Angabe dieses Abstandwertes, so konnte keiner Literatur, die sich mit Biotransformation und Hautzellen befasst, ein solcher Wert entnommen werden. Im Zusammenhang mit apoptotischen und nekrotischen Vorgängen in der Haut war der Abstand häufig angegeben. Dabei reichten die Werte von 20cm (Studien an HaCaT- Zellen [95;207]) bis zu 35cm (bei Verwendung von HaCaT [177] und NHK [69]). Ein weiteres Kriterium, das sich zwischen den Arbeiten verschiedener Autoren erheblich unterschied, ist die Zeit, welche die bestrahlten Zellen anschließend im Medium inkubiert wurden. Diese Zeit variierte allein bei Untersuchungen an HaCaT- Zellen zwischen 3h [207]; 5 bis 6 Stunden [200]; 8 und 24h [177]; 24h [121;146] bis hin zu 1, 4, 8, 24 und 48h [83]. Da in weiteren Studien mit verschiedenen Zellarten eine Inkubationszeit im Medium nach der Bestrahlung von 24 Stunden dominierte, kam sie auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

*UVA- Bestrahlung und Proteingehalt:*

Obwohl die Proteingehalte nach UVA und Umsetzung mit *Ethoxyresorufin (ER)* einigen Schwankungen unterlagen, war nach 48-stündiger Induktionszeit und damit 96h nach der Bestrahlung eine leichte Zunahme des Proteingehaltes mit steigender UVA- Dosis von ca. 200µg/ml auf ca. 230µg/ml (bei konstanter ER- Konzentration) zu verzeichnen. Deutlich höher fielen die Werte nach 24-stündiger Inkubation (72h nach UVA- Bestrahlung) aus. Eine Abhängigkeit von der UVA- Strahlendosis war nicht klar zu belegen, lediglich die Proteinmengen nach UVA (1 J/cm<sup>2</sup>) fielen höher als die der anderen bestrahlten Proben aus. Es ergaben sich für die unbestrahlten Zellen nach dem 72-stündigem Versuch Proteinmengen von im Mittel 390µg/ml, in den bestrahlten Proben lagen die Proteinmengen bei durchschnittlich 450µg/ml, für die mit 1 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Zellen ergab sich 480µg/ml Protein.

Der Proteingehalt nach UVA und *Ethoxycoumarin (EC)* ergab die größten Werte von ca. 270µg/ml nach 1 J/cm<sup>2</sup> UVA bei 24-stündiger Inkubation. Die Höheren Dosen von 8 und 16 J/cm<sup>2</sup> führten zu geringeren Werten. Mit UVA (16 J/cm<sup>2</sup>) ergaben sich Proteinmengen von 200µg/ml; der gleiche Wert, der in den unbestrahlten, EC- behandelten Kontrollgruppen erreicht wurde. Durch längere Inkubationszeiten verringerte sich der Proteingehalt ebenfalls, so lag er nach 96-stündiger Inkubation und UVA (1 J/cm<sup>2</sup>) bei nur noch 100µg/ml.

*UVB- Bestrahlung und Proteingehalt:*

Ausgehend von Proteinmengen um 200µg/ml für die unbestrahlten Kontrollgruppen nahm in den Versuchen UVB und *EROD* mit steigender UVB-Dosis der Proteingehalt bis auf über 300µg/ml zu (Abb. 5.3.19), wobei sich zwischen dem 72- und dem 96-stündigem Versuch kaum Unterschiede ergaben. Die Versuche UVB-*ECOD* ergaben für die unbestrahlten Kontrollen ebenfalls Proteinmengen um 200µg/ml. Hier nahm der Proteingehalt mit steigender Strahlendosis bis auf ca.120 µg/ml ab (Abb. 5.3.32).

Eine allein durch die UVB- Bestrahlung ausgelöste Schädigung der Zellen konnte für dieses gegensätzliche Verhalten nicht die Ursache sein. HaCaT- Zellen, welche mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt wurden und nur im Medium wuchsen, wiesen selbst nach 128h, keine signifikante MTT- Toxizität auf (Abb. 5.3.10). Da diese Zellen weder induziert, noch inhibiert wurden, sondern nur mit Medium inkubiert und später mit 7-Ethoxyresorufin bzw. 7-Ethoxycoumarin behandelt wurden, liegt die einzige Ursache der gegensätzlichen Entwicklung der Proteinmengen bei den Substraten selbst.

Obwohl für die ECOD- Untersuchungen kein Toxizitätstest unter Versuchsbedingungen durchgeführt wurde, ist die Herabsetzung der Proteinmengen mit zunehmender UVB- Strahlendosis mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine steigende Toxizität des Substrates 7-EC unter dem Einfluss der UVB- Strahlung zurückzuführen. Eine Abnahme des Proteingehaltes gilt als ein Hinweis auf die Schädigungen von Zellen. In der Folge der Zellschädigung kommt es zum Verlust oder zur Herabsetzung der Membranintegrität, wodurch zunächst die im Plasma gelösten Proteine aus der Zelle austreten und so durch den BioRad-Protein-Assay nicht mit erfasst werden. Ist diese Störung in der Membranintegrität nicht reparabel, stirbt die Zelle ab.

Insgesamt fiel auf, dass in jedem Versuch nach UVA oder UVB- Bestrahlung die Protein-Mengen zwischen den einzelnen Gruppen sich nicht unterschieden, d.h. die mit Medium behandelten Zellen lieferten gleiche Protein- Mengen wie die mit 3-MC (oder PB) behandelten Zellen und wie die mit 3-MC +  $\alpha$ -NP- behandelten Zellen. Durch den Einsatz von Induktoren erfolgte, wie bereits beschrieben, keine Zunahme der Protein- Menge.

#### c) Phase-II-Metabolite

EROD- Untersuchungen von Kern, A. et al. an Hepatozyten ergaben einen sehr großen Anteil an unkonjugiertem Resorufin (über 90%). Gegenteilig fielen die Ergebnisse der ECOD- Untersuchung aus. Hier gab es bis zu 96% Umbelliferon- Glucuronide und zusätzlich bildeten sich noch einige Sulfate. Der Anteil an freiem Umbelliferon lag an der Detektionsgrenze.

[101]

Ähnlich fielen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen an HaCaT- Keratinozyten aus. Es wurde bei der Bestimmung der EROD- Aktivität nur freies, unkonjugiertes Resorufin bestimmt. Die Bildung von Resorufin- Glucuroniden und Sulfaten konnte ausgeschlossen werden. Dagegen waren bei der Ermittlung der ECOD- Aktivität ausschließlich Konjugate detektierbar. Obwohl sich die beiden Arbeiten hinsichtlich der Zellart unterscheiden - es wurde einerseits mit Hepatozyten, in der vorliegenden Arbeit mit HaCaT- Keratinozyten gearbeitet - zeigte sich hinsichtlich der Bildung von Phase-II-Metaboliten ein eindeutige Tendenz, die weniger von den Zellen, als hauptsächlich vom gebildeten Phase-I-Metabolit abhängig war. Für die Testosteron- Metabolisierung und die DAB- Reduktion wurden keine Untersuchungen zu Phase-II-Metaboliten durchgeführt.

## 7 Zusammenfassung

Durch die vorliegende Arbeit mit vier verschiedenen Modellreaktionen konnten weitere Informationen zu Cytochrom-P-450-vermittelten, fremdstoffmetabolischen Enzymaktivitäten in der Keratinozytenzelllinie HaCaT gewonnen werden.

Mit dem Nachweis der basalen 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD), die als spezifisch für die CYP- Enzyme 1A1, 1A2 und 1B1 gilt, konnte deren Vorhandensein in HaCaT-Zellen belegt werden. Eine Induktion dieser Enzyme war durch 3-Methylcholanthrenen (3-MC) möglich, Phenobarbital führte zu keiner Erhöhung der Resorufin- Menge. Die 3-MC- bedingte Induktion ließ sich mit  $\alpha$ - Naphthoflavon ( $\alpha$ -NP) signifikant hemmen, je nach Ausmaß der vorangegangenen Induktion bis auf das Basallevel oder sogar darunter. Die Auswirkungen des als Inhibitor getesteten Proadifen konnten aufgrund dessen starker Toxizität nicht eindeutig beurteilt werden. Die der EROD als auch der Induktion vorangehende Bestrahlung der HaCaT- Zellen mit den UVA- Dosen 1; 8 und 16 J/cm<sup>2</sup> führte 72 Stunden nach der Bestrahlung zu keiner signifikanten Veränderung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase- Aktivität weder zwischen den verschiedenen Strahlendosen noch gegenüber den unbestrahlten Zellen. Vergingen nach der Bestrahlung 96 Stunden, wurde, bei sonst identischen Versuchsbedingungen, eine mit der UVA- Dosis steigende EROD- Aktivität ermittelt. In allen Versuchen wurde durch die UVA- Bestrahlung eine nicht dosisabhängige Zunahme der Proteinmenge gegenüber den unbestrahlten Zellen ermittelt. Die Bestrahlung mit UVB (25 bzw. 50 mJ/cm<sup>2</sup>) ergab 72 Stunden nach der Bestrahlung für die 25 mJ/cm<sup>2</sup>-bestrahlten Proben Resorufin- Werte im Bereich der unbestrahlten Kontrolle, dagegen konnte nach UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) nur ein siebtel dieser Werte ermittelt werden. Wenngleich ein MTT- Toxizitätstest mit dieser UVB- Dosis keine Hinweise auf signifikant schädigende Einflüsse ergab, wurden im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen beobachtet. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Verringerung der EROD- Aktivität nach UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) durch zellschädigende Einflüsse oder einer Herabsetzung der CYP1-spezifischen Enzymaktivitäten ausgelöst wurde, oder ob eine Kombination aus beiden Faktoren vorlag. Gegen toxische Effekte auf die Zellen sprach die stets mit der UVB- Dosis zunehmende Proteinmenge. Vergingen nach der Bestrahlung 96 Stunden, waren die Resorufin- Werte der unbestrahlten Kontrollen und der nach UVB (25 mJ/cm<sup>2</sup>) rückläufig, während die Werte nach UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) zunahmen. Insgesamt wurden zum gleichen Zeitpunkt nach der UVA- Bestrahlung höhere Enzymaktivitäten gegenüber der UVB- Bestrahlung ermittelt.

Mit der Modellreaktion der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) werden zwar vorwiegend die Enzyme CYP1A1 und 1A2 charakterisiert, daneben ist in menschlichem Gewebe auch eine Beteiligung von Enzymen der Familien CYP2 und CYP3 bekannt. Für HaCaT- Zellen wurde eine basale ECOD- Aktivität ermittelt. Mit 3-MC, nicht aber mit Phenobarbital, wurde nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Induktion der Umsetzung beobachtet, deren Ausmaß abhängig von der Konfluenz des Zellrasens und der Substratkonzentration war. Zunehmende Zeiten mit dem Induktor verringerten das Ausmaß der Induktion gegen null. Ein

Vergleich der Induktion, die sich nach 24-stündiger Induktion mit 3-MC (2 $\mu$ M) und anschließender 24-stündiger Umsetzung entweder mit 7-Ethoxyresorufin oder 7-Ethoxycoumarin ergab, führte für das erste Substrat zu einer 4-fachen Erhöhung und für 7-EC zu einer 5-fachen Induktion. Es konnte somit belegt werden, dass in HaCaT- Keratinozyten neben den CYP- Enzymen 1A1/2 und 1B1 noch weitere Enzyme induziert werden können. Eine Hemmung der durch 3-MC induzierten ECOD- Aktivität konnte mit  $\alpha$ - Naphthoflavon erreicht werden. Es gelang, mit  $\alpha$ -NP eine Inhibition zu erreichen, die abhängig war, vom Ausmaß der vorangegangenen Induktion und der Inhibitor- Konzentration selbst. Proadifen zeigte in geringerer Konzentration induzierende Effekte auf die ECOD, in höherer Konzentration wirkte es hemmend, wobei zusätzliche toxische Effekte erhöhter Proadifen- Konzentrationen relevant waren. Die UVA- Strahlung führte in Medium- behandelten Zellen zu einer Verringerung der 7-Hydroxycoumarin- Menge, in den Zellen, die mit 3-MC behandelt wurden, konnte eine Zunahme mit steigender Bestrahlungsintensität ermittelt werden. Insgesamt blieb der Einfluß von UVA- Strahlung auf HaCaT- Zellen sehr gering. Die Bestrahlung mit UVB ergab, dass mit steigender UVB- Dosis die Menge an 7-Hydroxycoumarin, und damit die 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung, rückläufig war, ganz gleich, ob im Basallevel oder den induzierten Zellen. Alle Bestimmungen der ECOD konnten nur nach vorangegangener Deglucuronidierung/- sulfatierung erfolgen, was das Ablaufen von Phase-II-Reaktionen in HaCaT- Zellen belegt.

Mit der Testosteron- Metabolisierung sollte eine für die Arzneistoff- Metabolisierung besonders bedeutsame Cytochrom- Subfamilie 3A charakterisiert werden, insbesondere das Enzym CYP3A4. Der basale Nachweis des CYP3A4-Metaboliten 6 $\beta$ -OH-Testosteron war nur nach Einsatz von Testosteron (250 $\mu$ M) möglich. Die Bildung dieses Metaboliten war auch stark zeitabhängig, so konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron nur unter Einsatz des Induktors Dexamethason eine Produktbildung verzeichnet werden, nach 48-stündiger Inkubation war die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron in allen untersuchten Fällen, so auch der Medium- Kontrolle möglich. Ein anderes Enzym, die 17 $\beta$ - Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (17 $\beta$ -HSD2), führt bereits nach 4 Stunden mit Testosteron zur Bildung von 4-Androsten-3,17-Dion (Andro). Eine signifikante Induktion der CYP3A4- vermittelten Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron war durch keinen Induktor zu beobachten, lediglich Dexamethason erwies sich leicht überlegen gegenüber den anderen Induktoren. Als einziger Induktor begünstigte 3-MC die Umsetzung zu Androstendion. Der an eine Induktion anschließende Einsatz der eigentlichen Inhibitoren Triacetyloleandomycin (TAO) und Proadifen führte in jeweils niedriger Konzentration, zu weit über das Kontrollniveau und die reinen Induktionswerte hinausgehenden Erhöhungen der 6 $\beta$ -OH-Testosteron- Menge. Die Hemmung der Umsetzung zu 6 $\beta$ -OH-Testosteron konnte mit TAO und Proadifen in höherer Konzentration und  $\alpha$ -NP erzielt werden. Die UVA- Strahlung reduzierte die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Die Androstendion- Bildung wurde durch UVA- Strahlung in den Medium- behandelten Zellen, als auch nach Rifampicin- und Dexamethason- Induktion nicht beeinflusst. Eine der UVA- Bestrahlung folgende Behandlung der HaCaT- Zellen mit 3-MC als

auch mit Phenobarbital führte zu breit streuenden Androstendion- Werten, die im Mittel über den unbestrahlten Kontrollwerten lagen. Die Bestrahlung mit UVB ( $25 \text{ mJ/cm}^2$ ) führte nach Rifampicin- Induktion zu einer dreifachen Erhöhung der  $6\beta$ -OH-Testosteron- Menge gegenüber der unbestrahlten Medium- Kontrolle. Die Werte nach Dexamethason, 3-MC und Phenobarbital- Behandlung lieferten CYP3A4-Metabolisierungsprodukte im Bereich der unbestrahlten Kontrollen. Die Bestrahlung der HaCaT- Zellen mit UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) führte zur 10-fachen Zunahme der Androstendion- Mengen nach Behandlung mit Rifampicin bzw. Dexamethason. In beiden Fällen konnte kein  $6\beta$ -OH-Testosteron bestimmt werden. Der Einsatz von 3-MC und PB lieferte  $6\beta$ -OH-Testosteron-Werte im Bereich der unbestrahlten Kontrollen. Für Zellen, die mit Medium inkubiert und mit UVB ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) bestrahlt wurden, ließ sich kein  $6\beta$ -OH-Testosteron nachweisen, die dazugehörenden Androstendion- Werte waren gegenüber den Kontrollwerten leicht erhöht. Als negativ muss die nur knapp 80%ige Wiederfindungsrate für  $6\beta$ -OH-Testosteron in Konzentrationsbereichen um  $10\mu\text{M}$  bewertet werden, wie sie für die Untersuchungen relevant waren.

In Abhängigkeit von der Zeit konnte eine nahezu lineare Zunahme der 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB) ermittelt werden. Der CYP4A- spezifische Induktor Clofibrat führte zu keiner Veränderung in den Produktmengen gegenüber unbehandelten HaCaT- Zellen. Auch der Einsatz der Inhibitoren Metyrapon und  $\alpha$ -NP blieben ohne Einfluss auf die DAB- Umsatzraten. Damit ließ sich für HaCaT- Zellen eine nicht CYP4A- katalysierte Reduktaseaktivität belegen.

## 8 Ausblick

Die bisher ermittelten Ergebnisse lassen viel Raum für weitere Untersuchungen.

Es sollte die Testosteron- Metabolisierung mit einer anderen Methodik, die den zuverlässigen Nachweis geringster Mengen 6 $\beta$ -OH-Testosteron erlaubt, wiederholt werden und in dem Zusammenhang auf mögliche weitere Metabolisierungsprodukte untersucht werden. Als weiterer Aspekt bei der Umsetzung von Testosteron kann untersucht werden, welches Verhalten die HaCaT- Zellen zeigen, wenn sie vor der Umsetzung nicht nur konfluent, sondern schon einige Tage bis Wochen alt sind.

Neben den in dieser Arbeit eingesetzten Modellreaktionen zur Charakterisierung von Cytochrom P450- Enzymen gibt es eine Vielzahl weiterer Reaktionen, mit denen das biotransformatorische Verhalten von HaCaT- Keratinozyten weiter beschrieben werden kann. Insbesondere die in dieser Arbeit nicht untersuchten Enzyme aus der Familie CYP2 bedürfen einer genaueren Charakterisierung.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Zellen stets erst der UV- Strahlung ausgesetzt, dann induziert und schließlich gehemmt und mit Substrat umgesetzt. In einer anderen möglichen Reihenfolge könnte die Bestrahlung nach der Induktion erfolgen. Dies würde den Fall simulieren, dass ein Arzneimittel, systemisch oder lokal verabreicht, die Keratinozyten induziert und anschließend UV-Strahlung auf die Haut trifft. Gerade für Testosteron wäre auch die Fragestellung interessant, was passiert mit der Biotransformation, wenn das Substrat sich auf der Haut befindet und es dann zu einer UV-Bestrahlung kommt. Dies kann allerdings für die anderen Reaktionen dieser Arbeit in der Form nicht untersucht werden, da die Substrate zu lichtempfindlich sind.

Ein weiterer möglicher Untersuchungsansatz wäre, wie wirkt sich eine wiederholte Induktion als auch eine wiederholte UV-Bestrahlung auf die Zellen aus?

Bisher noch nicht getestet wurde die gemeinsame Bestrahlung der HaCaT- Keratinozyten mit UVA- und UVB-Strahlung und deren Einfluss auf biotransformatorische Prozesse.

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	Seite
<b>Abb. 3.1.1:</b> Aufbau der menschlichen Haut .....	4
<b>Abb. 3.1.2:</b> Aufbau der menschlichen Epidermis.....	5
<b>Abb. 3.4.1:</b> Computer- modelliertes Bild mit Blick auf die prosthetische Gruppe des CYP450 - das Häm.....	9
<b>Abb. 3.4.2:</b> Cytochrom- Strukturen .....	10
<b>Abb. 3.4.3:</b> Schema der P450 Monooxygenasereaktion.....	11
<b>Abb. 3.4.4:</b> Mechanismus der CYP1A1-Induktion durch Aktivierung des Ah- Rezeptors ..	15
<b>Abb. 3.5.1:</b> 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung .....	20
<b>Abb. 3.5.2:</b> 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung.....	21
<b>Abb. 3.5.3:</b> Azoreduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen .....	24
<b>Abb. 3.5.4:</b> Kupplung von 4-(N,N-Dimethylamino)anilin an Fluorescamin .....	24
<b>Abb. 3.6.1:</b> Reduktive Spaltung des MTT zu Formazan .....	25
<b>Abb. 5.1.1:</b> Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medienwechsel nach 24h; Zellzahl bei Aussaat ca. $1 \times 10^4$ Zellen/ml .....	47
<b>Abb. 5.1.2:</b> Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medienwechsel nach 24h; Zellzahl bei Aussaat ca. $1 \times 10^5$ Zellen/ml .....	48
<b>Abb. 5.1.3:</b> Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P34, bei einmaligem Medium- wechsel nach 24h und schematische Darstellung der Proliferationsphasen von Zelllinien in Kultur .....	49
<b>Abb. 5.1.4:</b> Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P59, einmaliger Medien- Wechsel nach 24h; Vergleich unterschiedlicher Zelldichten bei der Aussaat....	49
<b>Abb. 5.1.5:</b> Wachstumskurven von HaCaT- Keratinozyten P70, bei Mediumwechsel alle 24h .....	50
<b>Abb. 5.1.6:</b> Phasen der Ausbildung einer HaCaT- Monolayerschicht, P39 .....	51
<b>Abb. 5.1.7:</b> Entwicklung von Zellzahl und Proteingehalt während des Wachstums von HaCaT- Keratinozyten; Kultivierungszeit 4 Tage (96h) .....	52
<b>Abb. 5.2.1:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxyresorufin</b> an konfluenten HaCaT- Keratinozyten P46 mittels NR- Test .....	54
<b>Abb. 5.2.2:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxycoumarin</b> an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test.....	55
<b>Abb. 5.2.3:</b> Zytotoxizität von <b>Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	55
<b>Abb. 5.2.4:</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Abb.5.2.3 a), aufgenommen 12h nach Zugabe von Testosteron.....	56
<b>Abb. 5.2.5:</b> Zytotoxizität von <b>Resorufin</b> an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test.....	57
<b>Abb. 5.2.6:</b> Zytotoxizität von <b>7-Hydroxycoumarin</b> an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test.....	57
<b>Abb. 5.2.7:</b> Zytotoxizität von <b>6-<math>\beta</math>-OH-Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	58
<b>Abb. 5.2.8:</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen von HaCaT- Keratinozyten 12h nach Zuga- be von 6- $\beta$ -OH-Testo (100 $\mu$ M) zu einem 50%ig konfluentem Monolayer .....	58

---

<b>Abb. 5.2.9:</b> Zytotoxizität von <b>2-<math>\alpha</math>-OH-Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	59
<b>Abb. 5.2.10:</b> Zytotoxizität von <b>4-Androsten-3,17-Dion</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	59
<b>Abb. 5.2.11:</b> Zytotoxizität von <b>3-Methylcholanthren</b> an HaCaT- Keratinozyten P48, ermittelt durch NR- Test.....	60
<b>Abb. 5.2.12:</b> Zytotoxizität von <b>Phenobarbital</b> an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test.....	60
<b>Abb. 5.2.13:</b> Zytotoxizität von <b>Dexamethason</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	61
<b>Abb. 5.2.14:</b> Zytotoxizität von <b>Rifampicin</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	61
<b>Abb. 5.2.15:</b> Zytotoxizität von <b><math>\alpha</math>-Naphthoflavin</b> an HaCaT- Keratinozyten P38-41(a); P40-44(b), ermittelt über 48h durch NR- Test.....	62
<b>Abb. 5.2.16:</b> Zytotoxizität von <b>Triacetyloleandomycin (TAO)</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch NR- Test.....	63
<b>Abb. 5.2.17:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxyresorufin</b> an HaCaT- Zellen P37 per MTT- Test ..	64
<b>Abb. 5.2.18:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxyresorufin</b> an konfluenten HaCaT- Keratinozyten P47 mittels MTT- Test ..	64
<b>Abb. 5.2.19:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxycoumarin</b> an HaCaT- Keratinozyten P58 mittels MTT- Test.....	65
<b>Abb. 5.2.20:</b> Zytotoxizität der kompletten Modellreaktion von <b>7-Ethoxycoumarin</b> an HaCaT- Keratinozyten P58 mittels MTT- Test (incl. Induktion / Inhibition)....	66
<b>Abb. 5.2.21:</b> Zytotoxizität von <b>Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	67
<b>Abb. 5.2.22:</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen zu Abb. 5.2.21, aufgenommen 24h nach Zugabe von Testosteron.....	67
<b>Abb. 5.2.23:</b> Zytotoxizität von <b>Resorufin</b> an HaCaT- Keratinozyten P44, ermittelt über 48h durch MTT- Test.....	68
<b>Abb. 5.2.24:</b> Zytotoxizität von <b>7-Hydroxycoumarin</b> an HaCaT- Keratinozyten P59, ermittelt über 48h durch MTT- Test.....	68
<b>Abb. 5.2.25:</b> Zytotoxizität von <b>6-<math>\beta</math>-OH-Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	69
<b>Abb. 5.2.26:</b> Zytotoxizität von <b>2-<math>\alpha</math>-OH-Testosteron</b> an HaCaT- Keratinozyten P41, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	69
<b>Abb. 5.2.27:</b> Zytotoxizität von <b>4-Androsten-3,17-Dion</b> an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	70
<b>Abb. 5.2.28:</b> Zytotoxizität von <b>3-Methylcholanthren</b> an HaCaT- Keratinozyten P37, ermittelt durch MTT- Test.....	70
<b>Abb. 5.2.29:</b> Zytotoxizität von <b>3-MC</b> an HaCaT- Keratinozyten, ermittelt über 72h durch MTT- Test.....	71
<b>Abb. 5.2.30:</b> Zytotoxizität von <b>Dexamethason</b> an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	72
<b>Abb. 5.2.31:</b> Zytotoxizität von <b><math>\alpha</math>-Naphthoflavin</b> an HaCaT- Keratinozyten P37, ermittelt durch MTT- Test.....	73

<b>Abb. 5.2.32:</b> Zytotoxizität von <b>Proadifen</b> an HaCaT- Keratinozyten P39 und P40, ermittelt durch MTT- Test.....	74
<b>Abb. 5.2.33:</b> Zytotoxizität von <b>Triacetyloleandomycin</b> an HaCaT- Keratinozyten P42, ermittelt über 53h durch MTT- Test.....	75
<b>Abb. 5.3.1:</b> Spektren von Resorufin (1µM) nach Vermessung in DMEM (Medium B).....	76
<b>Abb. 5.3.2:</b> 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der ER- Konzentration.....	76
<b>Abb. 5.3.3:</b> 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit ER.....	77
<b>Abb. 5.3.4:</b> 7-EROD an HaCaT- Keratinozyten – Basalaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit ER für 2 verschiedene Aussaatdichten.....	78
<b>Abb. 5.3.5:</b> 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion durch 3-Methylcholanthren; ER(2µM; 24h).....	79
<b>Abb. 5.3.6:</b> EROD an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion mit 3-MC;Abhängigkeit von Induktor- Konzentration und Induktionszeit; ER(2µM; 24h).....	79
<b>Abb. 5.3.7:</b> EROD an HaCaT- Keratinozyten nach Induktion mit 3-Methylcholanthren; Einfluss der Konfluenz zu Versuchsbeginn; ER (2µM; 24h).....	80
<b>Abb. 5.3.8:</b> EROD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren oder Phenobarbital; nachfolgend Hemmung durch α- Naphthoflavon oder Proadifen.....	81
<b>Abb. 5.3.9:</b> EROD an HaCaT mit/ohne anschließender Deglucuronidierung/-sulfatierung .	82
<b>Abb. 5.3.10:</b> Zytotoxizität nach Bestrahlung mit UVA (P53) und UVB (P48) an konfluenten HaCaT- Keratinozyten mittels MTT- Test.....	83
<b>Abb. 5.3.11:</b> EROD an HaCaT nach <u>UVA</u> - Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC ( <b>24h</b> ) und anschließender Hemmung per α- Naphthoflavon.....	84
<b>Abb. 5.3.12:</b> EROD an HaCaT nach <u>UVA</u> - Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC ( <b>48h</b> ) und anschließender Hemmung per α- Naphthoflavon.....	85
<b>Abb. 5.3.13:</b> EROD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per α- Naphthoflavon - Vergleich von 24stündiger und 48stündiger Induktionszeit-.....	86
<b>Abb. 5.3.14:</b> EROD an HaCaT nach UVA mit nachfolgender Induktion durch 3-MC und anschließender Hemmung per α- NP; Darstellung der prozentualen Resorufin-Menge (pmol/mg Protein), wenn die Kontr. ohne Ind. und Inh. = 100%.....	86
<b>Abb. 5.3.15:</b> MTT an HaCaT nach UVA- Bestrahlung, 3-MC-Induktion, α- NP- Hemmung und EROD.....	87
<b>Abb. 5.3.16:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme eines HaCaT- Monolayers 24h nach UVB- Bestrahlung; links: 100 mJ/cm <sup>2</sup> ; rechts: unbestrahlte Kontrolle.....	88
<b>Abb. 5.3.17:</b> Auftreffen ausgewählter UVB- Dosen auf der Erde.....	88
<b>Abb. 5.3.18:</b> EROD an HaCaT nach UV- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion (48h) durch 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per α- NP.....	89
<b>Abb. 5.3.19:</b> Proteingehalt zu: EROD an HaCaT nach <u>UVB</u> - Bestrahlung, Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per α- NP.....	90
<b>Abb. 5.3.20:</b> EROD an HaCaT nach UVB- Strahlung mit nachfolgender Induktion per 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per α- NP – Vergleich von 24-stündiger mit 48stündiger Induktionszeit.....	91

---

<b>Abb. 5.3.21:</b> EROD an HaCaT nach UVB mit nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB und Hemmung per $\alpha$ - NP; Darstellung der prozentualen Resorufin-Menge (pmol/mg Protein), wenn die Kontrolle ohne Ind. und Inh. = 100%.....	92
<b>Abb. 5.3.22:</b> MTT an HaCaT nach UVB- Bestrahlung, nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per $\alpha$ - NP und anschließender EROD.....	93
<b>Abb. 5.3.23:</b> NR an HaCaT nach UVB- Bestrahlung, nachfolgender Induktion durch 3-MC oder PB, Hemmung per $\alpha$ - NP und anschließender EROD.....	94
<b>Abb. 5.3.24:</b> Spektren von 7-Hydroxycoumarin (1 $\mu$ M) nach Vermessung in DMEM-Medium B <sub>alk</sub> .....	96
<b>Abb. 5.3.25:</b> ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per $\alpha$ - Naphthoflavon unter verschiedenen Assay- Bedingungen....	96
<b>Abb. 5.3.26:</b> ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-Methylcholanthren und anschließender Hemmung per $\alpha$ - Naphthoflavon oder Proadifen.....	98
<b>Abb. 5.3.27:</b> ECOD an HaCaT nach Induktion mit 3-MC oder PB und anschließender Hemmung per $\alpha$ - Naphthoflavon oder Proadifen.....	99
<b>Abb. 5.3.28:</b> ECOD an HaCaT nach <u>UVA</u> - Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon.....	101
<b>Abb. 5.3.29:</b> ECOD an HaCaT nach UVA- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC über verschiedene Zeiten und Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon.....	102
<b>Abb. 5.3.30:</b> ECOD an HaCaT nach <u>UVB</u> - Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-Methylcholanthren und Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon.....	103
<b>Abb. 5.3.31:</b> ECOD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC, Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon oder Proadifen .....	104
<b>Abb. 5.3.32:</b> Proteingehalt nach ECOD an HaCaT nach UVB, Induktion durch 3-MC und Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon oder Proadifen – zu Abb. 5.3.31 .....	105
<b>Abb. 5.3.33:</b> ECOD an HaCaT nach UVB- Bestrahlung mit nachfolgender Induktion durch 3-MC, Hemmung per $\alpha$ -Naphthoflavon.....	106
<b>Abb. 5.3.34:</b> Absorptionsspektren aller bei der Testosteron- Metabolisierung zum Einsatz kommenden Substanzen (gelöst in DMSO und Medium B) .....	107
<b>Abb. 5.3.35:</b> Chromatogramme aller bei der Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Zellen verwendeten Substanzen.....	108
<b>Abb. 5.3.36:</b> Kalibriergeraden von Testosteron, Androsteron, 2 $\alpha$ -OH- und 6 $\beta$ -OH-Testosteron .....	109
<b>Abb. 5.3.37:</b> Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten bei unterschiedlicher Ausgangskonzentration und variierender Inkubationszeit mit dem Substrat ....	110
<b>Abb. 5.3.38:</b> Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten nach vorheriger Inkubation mit verschiedenen Induktoren über 48h, 69h und 72h sowie mit unterschiedlichen Zeiten der Testosteroninkubation .....	111
<b>Abb. 5.3.39:</b> Der periphere Androgen- Metabolismus, insbesondere des Testosterons.....	113
<b>Abb. 5.3.40:</b> Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Zellen nach vorheriger Induktion für 72h sowie nachfolgender Inhibition (48h) .....	114
<b>Abb. 5.3.41:</b> Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten über 48h nach vorangegangener UVA- Bestrahlung und 72-stündiger Induktion.....	116

---

<b>Abb. 5.3.42:</b> Testosteron- Metabolisierung an HaCaT- Keratinozyten über 48h nach vorangegangener UVB- Bestrahlung und 72-stündiger Induktion.....	118
<b>Abb. 5.3.43:</b> Bestimmung der Wiederfindungsraten von Testosteron, Androstendion und 6 $\beta$ -OH-Testosteron .....	119
<b>Abb. 5.3.44:</b> Spektren des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin (1mM) und Fluorescamin (1,5mM) .....	120
<b>Abb. 5.3.45:</b> Bildung des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin und Fluorescamin (1,5mM) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit DAB (200 $\mu$ M) .....	120
<b>Abb. 5.3.46:</b> Azoreduktion von DAB (200 $\mu$ M) an HaCaT- Zellen nach Induktion durch Clofibrat oder 3-MC, nachfolgend Hemmung durch Metyrapon oder $\alpha$ -NP (Erfassung des Kupplungsproduktes aus 4-(N,N-Dimethylamino)anilin und Fluorescamin .....	121
<b>Tab. 3.5.1:</b> Überblick über Phase-I-Reaktionen.....	18
<b>Tab. 3.5.2:</b> CYP- Isoenzyme der Rattenleber, das dem Menschen zugeordnete, adäquate CYP- Isoenzym und die beim Testosteron- Metabolismus vorwiegend entstehenden Hydroxylierungsprodukte .....	22
<b>Tab. 5.1.1:</b> Entwicklung von Zellzahl und Proteingehalt während des Wachstums von HaCaT- Keratinozyten P39; Medienwechsel nach 48h; Kultivierungszeit 4 Tage (96h).....	52
<b>Tab. 5.2.1:</b> Zytotoxizität von <b>7-Ethoxyresorufin</b> an HaCaT- Keratinozyten ermittelt per MTT- Test, hervorgehoben die Werte für die Lebensfähigkeit [%].....	65
<b>Tab. 5.2.2:</b> Zytotoxizität von <b>Phenobarbital</b> an HaCaT- Keratinozyten per MTT- Test, Werte für 40% und 70% Konfl. aus [51]; Konfluenzangabe zu Versuchsbeginn.....	72
<b>Tab. 5.2.3:</b> Zytotoxizität von <b>Proadifen</b> an HaCaT- Keratinozyten mittels MTT- Test, Werte für 40% und 70% Konfluenz aus [51]; Konfluenzangabe zu Versuchsbeginn ..	74
<b>Tab. 5.3.1:</b> Darstellung der <b>x</b> -fachen Induktion des CYP1A1/A2 charakterisiert durch EROD und 3-MC- Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ER(2 $\mu$ M; 24h).....	80

## 9 Literaturverzeichnis

- (1) <http://www.icgeb.org/~p450srv/biblioA.html>
- (2) <http://www.icgeb.org/~p450srv/classdistrib.html>
- (3) <http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/biochemie/>
- (4) <http://www.psoriasiswelt.de>
- (5) <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/default.htm>
- (6) <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- (7) <http://www.free.de/WiLa/derik/EXISTHUM.html>
- (8) 't-Klooster,G.A.; Blaauboer,B.J.; Noordhoek,J.; van Miert,A.S.: "Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep and cattle." *Biochem Pharmacol* 1993; 46(10): 1781-1790
- (9) Afaq,F.; Mukhtar,H.: "Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways." *J Photochem Photobiol B* 2001; 63(1-3): 61-69
- (10) Aitio,A.: "A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation." *Anal Biochem* 1978; 85(2): 488-491
- (11) Aklillu,E.; Ovrebo,S.; Botnen,I.V.; Otter,C.; Ingelman-Sundberg,M.: "Characterization of common CYP1B1 variants with different capacity for benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol epoxide formation from benzo[a]pyrene." *Cancer Res* 2005; 65(12): 5105-5111
- (12) Altenburger,R.; Kissel,T.: "The human keratinocyte cell line HaCaT: an in vitro cell culture model for keratinocyte testosterone metabolism." *Pharm Res* 1999; 16(5): 766-771
- (13) Anders,M.W.; Alvares,A.P.; Mannering,G.J.: "Inhibition of drug metabolism. II.) Metabolism of 2-Diethylaminoethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525-A)." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1966; 2: 328-334
- (14) Anders,M.W.; Mannering,G.J.: "Inhibition of drug metabolism. I.) Kinetics of the Inhibition of the N-Demethylation of Ethylmorphine by 2-Diethylaminoethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525-A) and Related Compounds." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1966; 2: 319-327
- (15) Anders,M.W.; Mannering,G.J.: "Inhibition of drug metabolism. IV.) Induction of drug metabolism by 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerat HCl (SKF 525-A) and 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyldiethylamine HBr (Lilly18947) and the effect of induction on the inhibitory properties of SKF525-A type compounds." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1966; 2: 341-346
- (16) Aoyama,T.; Hardwick,J.P.; Imaoka,S.; Funae,Y.; Gelboin,H.V.; Gonzalez,F.J.: "Clofibrate- inducible rat hepatic P450s IVA1 and IVA3 catalyse the  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation of fatty acids and the  $\omega$ -hydroxylation of prostaglandins E<sub>1</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub> ." *J Lipid Res* 1990; 31: 1477
- (17) Bae,D.S.; Gennings,C.; Carter,W.H., Jr.; Yang,R.S.H.; Campain,J.A.: "Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes." *Toxicol Sci* 2001; 63(1): 132-142
- (18) Baron,J.M.; Holler,D.; Schiffer,R.; Frankenberg,S.; Neis,M.; Merk,H.F. et al.: "Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes." *J Invest Dermatol* 2001; 116(4): 541-548
- (19) Benedetti,M.S.: "Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies." *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14(4): 301-319
- (20) Bernstein,I.A.; Vaughan,F.L.: "Cultured keratinocytes in in vitro dermatotoxicological investigation: a review." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1999; 2(1): 1-30
- (21) Bonse,G. and Metzler,M.: "Biotransformation organischer Fremdstoffen"; Stuttgart: Georg-Thieme- Verlag, 1978

- (22) Borchert,H.H.: "Biotransformation und Arzneimittelwirkung - Teil 1: Das Cytochrom-P-450-System." *PZ Prisma* 1999; 6(3): 173-184
- (23) Borchert,H.H.: "Biotransformation und Arzneimittelwirkung - Teil 2: Nicht durch das Cytochrom-P-450-System katalysierte Reaktionen." *PZ Prisma* 1999; 6(4): 255-264
- (24) Borenfreund,E.; Babich,H.; Martin-Alguacil N.: "Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests." *Toxicology in Vitro* 1988; 2(1): 1-6
- (25) Borenfreund,E.; Puerner,J.A.: "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption." *Toxicology Letters* 1985; 24(2-3): 119-124
- (26) Boukamp,P.: "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *Journal of Cell Biology* 1988; 106(3): 761-771
- (27) Branch,R.A.; Adedoyin,A.; Frye,R.F.; Wilson,J.W.; Romkes,M.: "In vivo modulation of CYP enzymes by quinidine and rifampin." *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(4): 401-411
- (28) Braut-Boucher F.; Pichon,J.; Wantyghem,J.; Muriel,M.P.; Giner,M.; Font,J. et al.: "Human keratinocyte models: Assessment of cell adhesion and dermatotoxicity using fluorescent probes." *Toxicology in Vitro* 1997; 11(5): 601-611
- (29) Breitskreutz,D.: "Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants." *European Journal of Cell Biology* 1998; 75(3): 273-286
- (30) Breitskreutz,D.; Stark,H.J.; Plein,P.; Baur,M.; Fusenig,N.E.: "Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca<sup>2+</sup>." *DIFFERENTIATION* 1993; 54(3): 201-217
- (31) Brosin,A.; Wolf,V.; Mattheus,A.; Heise,H.: "Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants." *Acta Derm Venereol* 1997; 77(1): 26-28
- (32) Buddecke,E.: "Grundriss der Biochemie";8. Auflage; Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1989
- (33) Buening,M.K.; Franklin,M.R.: "SKF 525-A inhibition, induction and 452nm complex formation." *Drug Metabolism and Disposition* 1976; 4(3): 244-255
- (34) Burke,M.D.; Mayer,R.T.; Kouri,R.E.: "3-Methylcholanthrene-induced monooxygenase (O-deethylation) activity of human lymphocytes." *Cancer Research* 1977; 37(2): 460-463
- (35) Burke,M.D.; Prough,R.A.; Mayer,R.T.: "Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction: ethoxyresorufin oxygen-de-ethylation." *Drug Metabolism and Disposition* 1977; 5(1): 1-8
- (36) Burke,M.D.; Thompson,S.; Elcombe,C.R.; Halpert,J.; Haaparanta,T.; Mayer,R.T.: "Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450." *Biochem Pharmacol* 1985; 34(18): 3337-3345
- (37) Carmichael,J.; DeGraff,W.G.; Gazdar,A.F.; Minna,J.D.; Mitchell,J.B.: "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." *Cancer Research* 1987; 47(4): 936-942
- (38) Carrillo,J.A.; Benitez,J.: "Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications." *Clin Pharmacokinet* 2000; 39(2): 127-153
- (39) Chang,T.K.; Gonzalez,F.J.; Waxman,D.J.: "Evaluation of Triacetyloleandomycin, a-Naphthoflavone and Diethylthiocarbamate as Selective Chemical Probes for Inhibition of Human Cytochromes P450." *Arch Biochem Biophys* 1994; 311(2): 437-442
- (40) Chiba,K.; Kawakami,K.; Tohyama,K.: "Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells." *Toxicology in Vitro* 1998; 12(3): 251-258
- (41) Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., LeBoeuf, R., Marquardt, H., McCormick, J., Muller, L., Rivedal, E., Sabbioni, E., Tanaka, N., Vasseur, P., and Yamasaki, H.: "Cell Transformation Assays as Predictors of Human Carcinogenicity." ECVAM-European Centre for the Validation of Alternative Methods.; 2001;27; 745-767. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 39

- (42) Cotovio,J.; Leclaire,J.; Roguet,R.: "Cytochrome P450-dependent enzyme activities in normal adult human keratinocyte and transformed human keratinocytes." *In Vitro Toxicology* 1997; 10(2): 207-216
- (43) Cotovio,J.; Roguet,R.; Pion,F.X.; Rougier,A.; Leclaire,J.: "Effect of imidazole derivatives on cytochrome P-450 enzyme activities in a reconstructed human epidermis." *Skin Pharmacology* 1996; 9(4): 242-249
- (44) Cupp,M.J.; Tracy,T.S.: "Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications." *Am Fam Physician* 1998; 57(1): 107-116
- (45) Damen,F.J.M.; Mier,P.D.: "Cytochrome P-450-dependent O-dealkylase activity in mammalian skin." *British journal of pharmacology* 1982; 75(1): 123-127
- (46) de-Sousa,G.; Delescluse,C.; Pralavorio,M.; Perichaud,M.; Avon,M.; Lafaurie,M. et al.: "Toxic effects of several types of antifouling paints in human and rat hepatic or epidermal cells." *Toxicology Letters* 1998; 96-97: 41-46
- (47) Delescluse,C.; Ledirac,N.; de Sousa,G.; Pralavorio,M.; Lesca,P.; Rahmani,R.: "Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor." *Toxicology Letters* 1998; 96-7: 33-39
- (48) Delescluse,C.; Ledirac,N.; deSousa,G.; Pralavorio,M.; BottaFridlund,D.; Letreut,Y. et al.: "Comparative study of CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene in various human hepatic and epidermal cell types." *Toxicology in Vitro* 1997; 11(5): 443-450
- (49) Delescluse,C.; Lemaire,G.; de Sousa,G.; Rahmani,R.: "Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?" *TOXICOLOGY* 2000; 153(1-3): 73-82
- (50) Didier,C.; Emonet,P.N.; Beani,J.C.; Cadet,J.; Richard,M.J.: "L-arginine increases UVA cytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line: potential role of nitric oxide." *FASEB J* 1999; 13(13): 1817-1824
- (51) Dietrich,A.; "Untersuchungen zur Biotransformation in der Haut am Beispiel der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Erfassung fremdstoffmetabolischer Enzymaktivitäten zur Charakterisierung der Cytochrom- Isoenzyme der Familie 1A/ 1B und 4A"; Diplomarbeit - Math.-Nat.-Tech.-Fak; MLU Halle- Wittenberg, 2005
- (52) Doostdar,H.; Grant,M.H.; Melvin,W.T.; Wolf,C.R.; Burke,M.D.: "The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HEPG2 hepatoma cells." *Biochem Pharmacol* 1993; 46(4): 629-635
- (53) <http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/html/ModMethDrugDiscWS0506.htm>
- (54) Draper,A.J.; Madan,A.; Smith,K.; Parkinson,A.: "Development of a non-high pressure liquid chromatography assay to determine testosterone hydroxylase (CYP3A) activity in human liver microsomes." *Drug Metabolism and Disposition* 1998; 26(4): 299-304
- (55) Edwards,A.M.; Glistak,M.L.; Lucas,C.M.; Wilson,P.A.: "7-Ethoxycoumarin deethylase activity as a convenient measure of liver drug metabolizing enzymes: regulation in cultured rat hepatocytes." *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1537-1546
- (56) Ermolli,M.; Menne,C.; Pozzi,G.; Serra,M.A.; Clerici,L.A.: "Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human HaCaT keratinocytes." *TOXICOLOGY* 2001; 159(1-2): 23-31
- (57) Finnen,M.J.; Herdman,M.L.; Shuster,S.: "Distribution and sub-cellular localization of drug metabolizing enzymes in the skin." *British Journal of Dermatology* 1985; 113(6): 713-721
- (58) Fischer,V.; Rodriguez-Gascon,A.; Heitz,F.; Tynes,R.; Hauck,C.; Cohen,D. et al.: "The multidrug resistance modulator valsopodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite." *Drug Metabolism and Disposition* 2000; 26(8): 802-811

- (59) Fleischmann R, Remmer H; "The action of estrogens on the activity of drug-metabolizing enzymes in human liver and its possible relation to cholestasis and liver tumors." *Probl. Intrahepatic Cholestasis, Int. Symp., 2nd 1979*;93-101;
- (60) Forman,B.M.; Chen,J.; Evans,R.: "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxysome proliferator- activated receptors  $\alpha$  and  $\delta$ ." *Proc Natl Acad Sci U S A 1997*; 94: 4312-4317
- (61) Freshney,R.I.: "Tierische Zellkulturen - Ein Methoden- Handbuch";Deutsche Ausgabe der 2. Auflage; Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1990
- (62) Fritsch,M.; Orfanos,C.E.; Zouboulis,C.C.: "Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin." *Journal of Investigative Dermatology 2001*; 116(5): 793-800
- (63) Fritsch,P.: "Dermatologie - Aufbau und Funktion der normalen Haut";3. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona: Springer Verlag, 1990
- (64) Fukunaga,M.; Oka,M.; Ichihashi,M.; Yamamoto,T.; Matsuzaki,H.; Kikkawa,U.: "UV-Induced Tyrosine Phosphorylation of PKC.delta. and Promotion of Apoptosis in the HaCaT Cell Line." *Biochem Biophys Res Commun 2001*; 289(2): 573-579
- (65) Gaido,K.W.; Maness,S.C.: "Regulation of gene expression and acceleration of differentiation in human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *Toxicol Appl Pharmacol 1994*; 127(2): 199-208
- (66) Galisteo,M.; Marc,N.; FAUTREL,A.; Guillouzo,A.; Corcos,L.; Lagadic-Gossmann,D.: "Involvement of cyclic nucleotide- and calcium-regulated pathways in phenobarbital-induced cytochrome P-450 3A expression in mouse primary hepatocytes." *J Pharmacol Exp Ther 1999*; 290(3): 1270-1277
- (67) Ganten,D. and Ruckpaul,K.: "Molekular- und Zellbiologische Grundlagen - Handbuch der Molekularen Medizin; Band 1"; Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1997
- (68) Gelardi,A.; Morini,F.; Dusatti,F.; Penco,S.; Ferro,M.: "Induction by xenobiotics of phase I and phase II enzyme activities in the human keratinocyte cell line NCTC 2544." *Toxicology in Vitro 2001*; 15(6): 701-711
- (69) Gniadecki,R.; Gajkowska,B.; Bartosik,J.; Hansen,M.; Wulf,H.C.: "Variable expression of apoptotic phenotype in keratinocytes treated with ultraviolet radiation, ceramide, or suspended in semisolid methylcellulose." *Acta Derm Venereol 1998*; 78(4): 248-257
- (70) Gniadecki,R.; Hansen,M.; Wulf,H.C.: "Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes." *J Invest Dermatol 1997*; 109(2): 163-169
- (71) Gniadecki,R.; Thorn,T.; Vicanova,J.; Petersen,A.; Wulf,H.C.: "Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress." *Journal of cellular biochemistry 2000*; 80(2): 216-222
- (72) Göhring,J.: "Untersuchungen zur Proliferationsbeeinflussung von HaCaT-Keratinozyten durch UV-Licht und zur Möglichkeit einer UV-Protektion mit bestimmten Flavonoiden."; Dissertationsschrift - Math.-Nat.-Tech.-Fak; MLU Halle- Wittenberg, 1999
- (73) Goldstein,J.A.; Linko,P.: "Differential induction of two 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible forms of cytochrome P-450 in extrahepatic versus hepatic tissues." *MOLECULAR PHARMACOLOGY 1984*; 25(1): 185-191
- (74) Gonzalez,M.C.; Marteau,C.; Franchi,J.; Migliore-Samour,D.: "Cytochrome P450 4A11 expression in human keratinocytes: effects of ultraviolet irradiation." *British Journal of Dermatology 2001*; 145(5): 749-757
- (75) Goodwin,B.; Liddle,C.; Murray,M.; Tapner,M.; Rooney,T.; Farrell,G.C.: "Effects of metyrapone on expression of CYPs 2C11, 3A2, and other 3A genes in rat hepatocytes cultured on matrigel." *Biochem Pharmacol 1996*; 52(2): 219-227
- (76) Grabbe,J.; Welker,P.; Rosenbach,T.; Nurnberg,W.; Kruger,K.S.; Artuc,M. et al.: "Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells." *J Invest Dermatol 1996*; 107(2): 219-224

- (77) Grant,M.H.; Burke,M.D.; Hawksworth,G.M.; Duthie,S.J.; Engeset,P.C.J.: "Human adult hepatocytes in primary monolayer culture. Maintenance of mixed function oxidase and conjugation pathways of drug metabolism." *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY* 1987; 36(14): 2311-2316
- (78) Grant,M.H.; Duthie,S.J.; Gray,A.G.; Burke,M.D.: "Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line." *Biochem Pharmacol* 1988; 37(21): 4111-4116
- (79) Greenlee,W.F.; Dold,K.M.; Hudson,L.G.; Young,M.J.; Toscano,W.A.Jr.: "Altered Regulation of Epidermal Cell Proliferation and Differentiation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." *Reviews in Biochemical Toxicology* 1987; 8: 1-35
- (80) Guengerich,F.P.: "Polymorphism of cytochrome P-450 in humans." *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(3): 107-109
- (81) Guengerich,F.P.; Martin,M., V; Beaune,P.H.; Kremers,P.; Wolff,T.; Waxman,D.J.: "Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism." *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(11): 5051-5060
- (82) Hanioka,N.; Jinno,H.; Nishimura,T.; Ando,M.: "Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver." *Arch Toxicol* 1998; 72(7): 387-394
- (83) Henseleit,U.; Rosenbach,T.; Kolde,G.: "Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes." *Archives of Dermatological Research* 1996; 288(11): 676-683
- (84) Henseleit,U.; Zhang,J.; Wanner,R.; Haase,I.; Kolde,G.; Rosenbach,T.: "Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes." *J Invest Dermatol* 1997; 109(6): 722-727
- (85) Hirel,B.; Chesne,C.; Pailheret,J.P.; Guillouzo,A.: "In vitro expression of drug metabolizing enzyme activities in human adult keratinocytes under various culture conditions and their response to inducers." *Toxicology in Vitro* 1995; 9(1): 49-56
- (86) Hoen,P.A.; Commandeur,J.N.; Vermeulen,N.P.; Van Berkel,T.J.; Bijsterbosch,M.K.: " Selective induction of cytochrome P450 3A1 by dexamethasone in cultured rat hepatocytes: analysis with a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay section sign." *Biochem Pharmacol* 2000; 60(10): 1509-1518
- (87) Hoensch,H.; Hartmann,F.; Schomerus,H.: "Monooxygenase activity in liver biopsies of patients with alcoholic liver damage, other liver diseases and the healthy liver." *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fuer Innere Medizin* 1977; 83: 540-543
- (88) Hoensch,H.; Hartmann,F.; Schomerus,H.; Bieck,P.; Dolle,W.: "Monooxygenase enzyme activity in alcoholics with varying degrees of liver damage." *Gut* 1979; 20(8): 666-672
- (89) Hofmann-Aßmus,M.: "UV-Schäden: Hautkrebs auf dem Vormarsch." *Pharmazeitische Zeitung* 2004; 28: 16-21
- (90) Huang,M.T.; Miwa,G.T.; Cronheim,N.; Lu,A.Y.: "Rat liver cytosolic azoreductase. Electron transport properties and the mechanism of dicumarol inhibition of the purified enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254(22): 11223-11227
- (91) Huang,M.T.; Miwa,G.T.; Lu,A.Y.: "Induction of rat liver cytosol methyl red azo-reductase by 3-methylcholanthrene assayed by a sensitive fluorometric method." *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83(4): 1253-1259
- (92) Huang,M.T.; Miwa,G.T.; Lu,A.Y.: "Rat liver cytosolic azoreductase. Purification and characterization." *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254(10): 3930-3934
- (93) Ioannides,C.; "Cytochromes P450 - Metabolic and Toxicological Aspects"; Boca Raton; New York; London; Tokyo: CRC Press, 1996
- (94) Ishida-Yamamoto,A.; Tanaka,H.; Nakane,H.; Takahashi,H.; Hashimoto,Y.; Iizuka,H.: "Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization." *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 1999; 4(2): 145-149

- (95) Isoherranen,K.; Punnonen,K.; Uotila,P.; Jansen,C.: "Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes." *British journal of pharmacology* 1999; 140(6): 1017-1022
- (96) Johnson,T.N.; Tanner,M.S.; Tucker,G.T.: "A comparison of the ontogeny of enterocytic and hepatic cytochromes P450 3A in the rat." *Biochem Pharmacol* 2000; 60(11): 1601-1610
- (97) Jones,D.R.; Gorski,J.C.; Haehner,B.D.; O'Mara,E.M., Jr.; Hall,S.D.: "Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation." *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60(4): 374-384
- (98) Jung,E.G. and Moll,I.; "Duale Reihe - Dermatologie";5.Auflage; Stuttgart: Georg- Thieme- Verlag, 2003
- (99) Katiyar,S.K.; Matsui,M.S.; Mukhtar,H.: "Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1." *Journal of Investigative Dermatology* 2000; 114(2): 328-333
- (100) Kawashima,H.; Kusunose,E.; Kubota,I.; Maekawa,M.; Kusunose,M.: "Purification and NH2- terminal amino acid sequences of human and rat kidney fatty acid  $\omega$ - hydroxylases." *Biochim Biophys Acta* 1992; 1123: 156
- (101) Kern,A.; Bader,A.; Pichlmayr,R.; Sewing,K.F.: "Drug Metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans." *Biochem Pharmacol* 1997; 54(7): 761-772
- (102) Kipp,C.; Young,A.R.: "The soluble eumelanin precursor 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid enhances oxidative damage in human keratinocyte DNA after UVA irradiation." *Photochem Photobiol* 1999; 70(2): 191-198
- (103) Kleinig,H., Sitte,P., and Maer,U.; "Zellbiologie";4. Auflage; Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: Gustav-Fischer-Verlag, 1999
- (104) Kolars,J.C.; Lown,K.S.; Schmiiedlin-Ren,P.: "CYP3A gene expression in human gut epithelium." *Pharmacogenetics* 1994; 4: 247-259
- (105) Kostrubsky,V.E.; Ramachandran,V.; Venkataramanan,R.; Dorko,K.; Esplen,J.E.; Zhang,S. et al.: "The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450." *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27(8): 887-894
- (106) Kumar,M.G.; Hurwitz,S.A.; Cotton,J.; Spandau,D.F.: "Subphysiological concentrations of extracellular calcium sensitize normal human keratinocytes to UVB-induced apoptosis." *Archives of Dermatological Research* 1999; 291(1): 37-46
- (107) Lacroix,D.; Sonnier,M.; Moncion,A.; Cheron,G.; Cresteil,T.: "Expression of CYP3A in the human liver. Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth." *Eur J Biochem* 1997; 247: 625-634
- (108) Langner,A.: "Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen." *Pharmazie unserer Zeit* 1995; 24(4): 207-218
- (109) Langner,A.: "Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen." *Pharmazie unserer Zeit* 1995; 24(4): 207-218
- (110) Ledirac,N.; Delescluse,C.; deSousa,G.; Pralavorio,M.; Lesca,P.; Amichot,M. et al.: "Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor." *Toxicology and Applied Pharmacology* 1997; 144(1): 177-182
- (111) Lee,D.W.; Lim,H.B.; Moon,J.Y.; Park,K.H.: "In vitro enhancement of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases by organic solvents in rat liver." *Journal-of-Biochemistry-and-Molecular-Biology* 1998; 31(4): 391-398
- (112) Lehman,T.A.; Modali,R.; Boukamp,P.; Stanek,J.; Bennett,W.P.; Welsh,J.A. et al.: "p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines." *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 833-839 [published erratum appeared in *Carcinogenesis* 1993 Jul;14(7):1491]
- (113) Levine,W.G.; Raza,H.: "Mechanism of Azoreduction of dimethylaminoazobenzene by rat liver NADPH-cytochrome P450 reductase and partially purified cytochrome P450." *Metabolism and Disposition* 1988; 16(3): 441-447

- (114) Lewis,D.F.V.; "Cytochromes P450 - Structure, Function and Mechanism"; London: Taylor & Francis Inc., 1996
- (115) Liem,H.H.; Muller-Eberhard,U.; Johnson,E.F.: "Differential induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of multiple forms of rabbit microsomal cytochrome P-450: evidence for tissue specificity." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1980; 18(3): 565-570
- (116) Lindl,T.; "Zell- und Gewebekultur";4.Auflage; Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2000
- (117) Little,M.C.; Metcalfe,R.A.; Haycock,J.W.; Healy,J.; Gawkrödger,D.J.; Mac,N.S.: "The participation of proliferative keratinocytes in the preimmune response to sensitizing agents." *British Journal of Dermatology* 1998; 138(1): 45-56
- (118) Lottspeich,F. and Zorbas,H.; "Bioanalytik"; Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998
- (119) Lu,C.; Li,A.P.: "Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog." *Chem Biol Interact* 2001; 134(3): 271-281
- (120) Maenpaa,J.; Sigusch,H.; Raunio,H.; Syngelma,T.; Vuorela,H.; Pelkonen,O.: "Differential inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in mouse and human liver microsomes." *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 1035
- (121) Mammone,T.; Gan,D.; Collins,D.; Lockshin,R.A.; Marenus,K.; Maes,D.: "Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation." *Cell Biology and Toxicology* 2000; 16: 293-302
- (122) Matthias,C.; Bockmuhl,U.; Jahnke,V.; Jones,P.W.; Hayes,J.D.; Aldersea,J. et al.: "Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers." *Pharmacogenetics* 1998; 8(2): 91-100
- (123) Maurel,P. "The CYP3 Family." Kapitel 10 in: Cytochromes P450 by Ioannides,C.; Boca Raton; New York; London; Tokyo: CRC Press, 1996: 241-270.
- (124) Maurice,M.; Pichard,L.; Daujat,M.; Fabre,I.; Joyeux,H.; Domergue,J. et al.: "Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture." *FASEB J* 1992; 6(2): 752-758
- (125) Merk,H.F.: "Induction and inhibition of NAD(P)H: quinone reductase in murine and human skin." *Skin Pharmacology* 1991; 4(3): 183-190
- (126) Meunier,V.; Bourrie,M.; Julian,B.; Marti,E.; Guillou,F.; Berger,Y. et al.: "Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up." *XENOBIOTICA* 2000; 30(6): 589-607
- (127) Michalets,E.L.: "Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions." *Pharmacotherapy* 1998; 18(1): 84-112
- (128) Mildner,M.; Weninger,W.; Trautinger,F.; Ban,J.; Tschachler,E.: "UVA and UVB radiation differentially regulate vascular endothelial growth factor expression in keratinocyte-derived cell lines and in human keratinocytes." *Photochem Photobiol* 1999; 70(4): 674-679
- (129) Miwa,G.T.; West,S.B.; Huang,M.T.; Lu,A.Y.: "Studies on the association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome c reductase during catalysis in a reconstituted hydroxylating system." *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254(13): 5695-5700
- (130) Monostory,K.: "Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes." *British journal of pharmacology* 1998; 123(4): 605-610
- (131) Monostory,K.; Vereczkey,L.: "Role of human cytochrome P-450 enzymes in the metabolism of xenobiotics." *Acta Pharm Hung* 1995; 65(5): 147-156

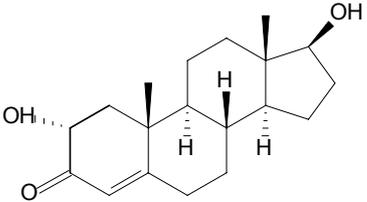
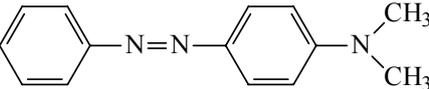
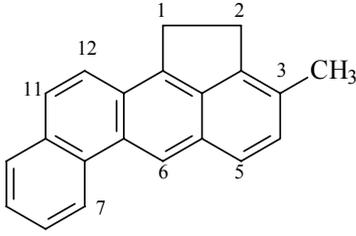
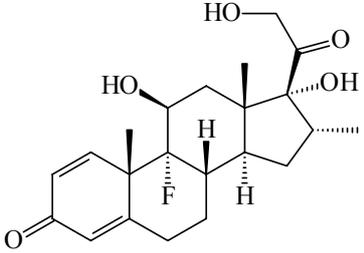
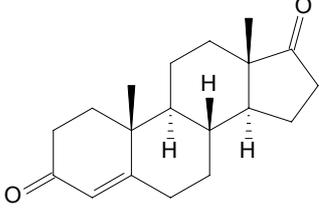
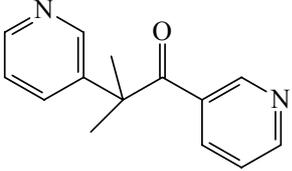
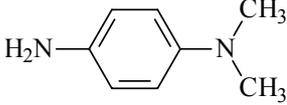
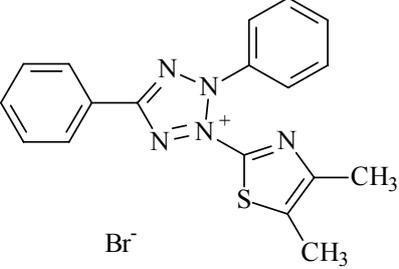
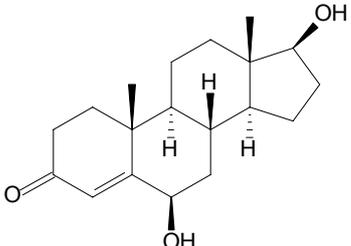
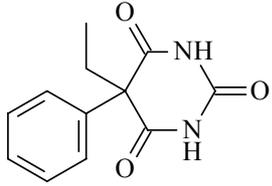
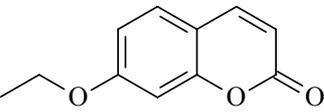
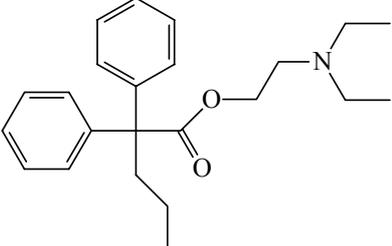
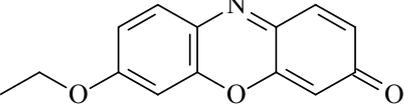
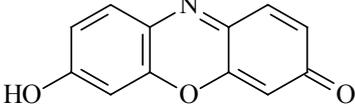
- (132) Mori,Y.; Niwa,T.; Toyoshi,K.: "Mutagenic activation of selected aminoazo compounds by rat liver: evidence for a cytochrome P-448 dependent reaction." *Gann* 1983; 74(4): 483-492
- (133) Mosmann T: "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1-2): 55-63
- (134) Mühlenfeld,K.; "Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie HepG2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistaratte."; Dissertationsschrift - Humboldt- Universität Berlin, Math.-Naturwissenschaftliche Fakultät, 1999
- (135) Mukhtar,H.; Athar,M.; Bickers,D.R.: "Cytochrome P-450 dependent metabolism of testosterone in rat skin." *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145(2): 749-753
- (136) Mukhtar,H.; Khan,W.A.; Bik,D.P.; Das,M.; Bickers,D.R.: "Hepatic microsomal metabolism of leukotriene B4 in rats: biochemical characterization, effect of inducers, and age- and sex-dependent differences." *XENOBIOTICA* 1989; 19(2): 151-159
- (137) Mutschler,E., Geisslinger,G., Kroemer,H.K., and Schäfer-Korting,M.; "Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie";8.Auflage; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001
- (138) Nebert,D.W.; Coon,M.J.; Estabrook,R.W.; Gonzalez,F.J.; Guengerich,F.P.; Gunsalus,I.C. et al.: "The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci." *DNA and cell biology* 1989; 8(1): 1-13
- (139) Nebert,D.W.; Fujii-Kuriyama,Y.; Gonzalez,F.J.; Guengerich,F.P.; Gunsalus,I.C.; Johnson,E.F. et al.: "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature." *DNA and cell biology* 1991; 10(1): 1-14
- (140) Nelson,D.R.: "Metazoan cytochrome P450 evolution." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 1998; 121C(1-3): 15-22
- (141) Nelson,D.R.; Kamataki,T.; Waxman,D.J.; Guengerich,F.P.; Estabrook,R.W.; Feyereisen,R. et al.: "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." *DNA and cell biology* 1993; 12(1): 1-51
- (142) Nelson,D.R.; Zeldin,D.C.; Hoffman,S.M.G.; Maltais,L.J.; Wain,H.M.; Nebert,D.W.: "Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants." *Pharmacogenetics* 2004; 14(1): 1-18
- (143) Neubert,R.H.H., Wohlrab,W.A., and Marsch,W.Ch.; "Dermatopharmazie - Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie"; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001
- (144) Nickel,A.; "Untersuchungen zum zytotoxischen und zytoprotektiven Potential ausgewählter Radikalfänger an humanen Keratinozyten."; Dissertationsschrift -Math.-Nat.-Tech.-Fak; MLU Halle-Wittenberg, 2001
- (145) Pan,L.P.; Wijnant,P.; De Vriendt,C.; Rosseel,M.T.; Belpaire,F.M.: "Characterization of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the in vitro N-dealkylation of haloperidol." *British journal of clinical pharmacology* 1997; 44(6): 557-564
- (146) Parat,M.O.; Richard,M.J.; Pollet,S.; Hadjur,C.; Favier,A.; Beani,J.C.: "Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells." *J of Photochemistry and Photobiology B, Biology* 1997; 37(1-2): 101-106
- (147) Pearce,R.E.; McIntyre,C.J.; Madan,A.; Sanzgiri,U.; Draper,A.J.; Bullock,P.L. et al.: "Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity." *Arch Biochem Biophys* 1997; 331(2): 145-169
- (148) Pelkonen,O.; Sotaniemi,E.A.; Ahokas,J.T.: "Coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Properties of the enzyme and interspecies comparisons." *Br J Clin Pharmacol* 1985; 19(1): 59-66
- (149) Pendlington,R.U.; Williams,D.L.; Naik,J.T.; Sharma,R.K.: "Distribution of xenobiotic metabolizing enzymes in skin." *Toxicology in Vitro* 1994; 8(4): 525-528

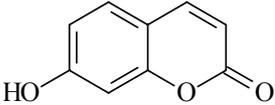
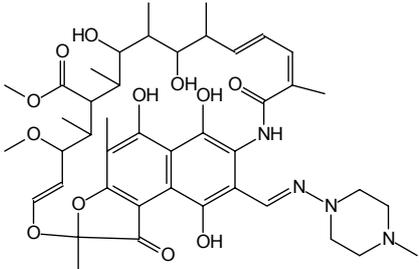
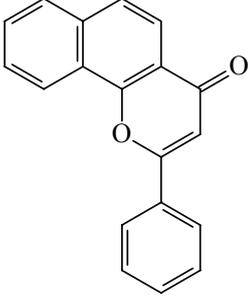
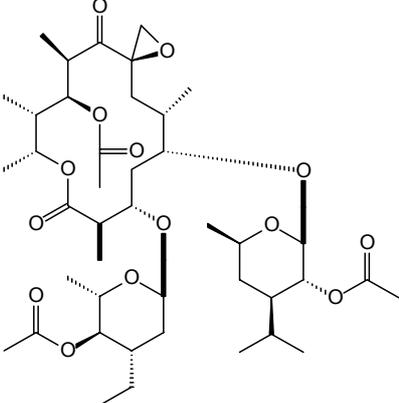
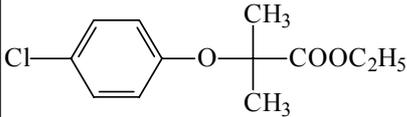
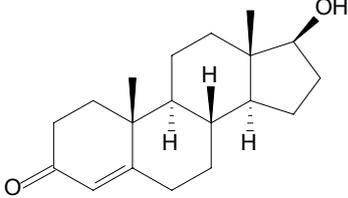
- (150) Pessayre,D.; Descatoire,V.; Konstantinova-Mitcheva,M.; Wandscheer,J.C.; Cobert,B.; Level,R. et al.: "Self-induction by triacetyloleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456nm-absorbing complex with cytochrome P450." *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 553
- (151) Pfeifer,S., Pflugel,P., and Borchert,H.H.: "Biopharmazie - Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation";3. Auflage; Berlin, Wiesbaden: 1995
- (152) Phillipson,R.P.; Tobi,S.E.; Morris,J.A.; McMillan,T.J.: "UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism." *Free Radic Biol Med* 2002; 32(5):474-480
- (153) Pohl,R.J.; Philpot,R.M.; Fouts,J.R.: "Cytochrome P-450 content and mixed-function oxidase activity in microsomes isolated from mouse skin." *Drug metabolism and disposition: biological fate of chemicals* 1976; 4(5): 442-450
- (154) Ponec,M.; Haverkort,M.; Soei,Y.L.; Kempenaar,J.; Boddé,H.E.: "Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds." *J Pharm Sci* 1990; 79: 312-316
- (155) Ponec,M.; Haverkort,M.; Soei,Y.L.; Kempenaar,J.; Brussee,J.; Bodde,H.E.: "Toxicity screening of n-alkylazacycloheptan-2-one derivatives in cultured human skin cells: Structure-toxicity relationships." *J Pharm Sci* 1989; 78: 738-741
- (156) Product- Description by BioRad; "Instructions for the BioRad Protein Assay." 1999; - Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
- (157) Product- Description by Roche; "Cell Proliferation Kit I (MTT)." 1999;
- (158) Radschuweit,A.; "Experimentelle Untersuchungen zur Photochemie und Phototoxikologie von Ketoprofen."; Dissertationsschrift - Math.-Nat.-Tech.-Fak; MLU Halle- Wittenberg, 2002
- (159) Raffali,F.; Rougier,A.; Roguet,R.: "Measurement and modulation of cytochrome-P450-dependent enzyme activity in cultured human keratinocytes." *Skin Pharmacology* 1994; 7(6): 345-354
- (160) Ramachandran,V.; Kostrubsky,V.E.; Komoroski,B.J.; Zhang,S.; Dorko,K.; Esplen,J.E. et al.: "Troglitazone increases cytochrome P-450 3A protein and activity in primary cultures of human hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27(10): 1194-1199
- (161) Raunio,H.; Hakkola,J.; Hukkanen,V.: "Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue." *Exp Toxicol Pathol* 1999; 51: 412-417
- (162) Raza,H.; Levine,W.G.: "Azoreduction of N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzene (DAB) by rat hepatic microsomes." *Drug Metabolism and Disposition* 1986; 14(1): 19-24
- (163) Reiners,J.J., Jr.; Cantu,A.R.; Pavone,A.; Smith,S.C.; Gardner,C.R.; Laskin,D.L.: "Fluorescence assay for per-cell estimation of cytochrome p-450-dependent monooxygenase activities in keratinocyte suspensions and cultures." *ANAL BIOCHEM* 1990; 188: 317-324
- (164) Reiners,J.J., Jr.; Jones,C.L.; Hong,N.; Myrand,S.P.: "Differential induction of Cyp1a1, Cyp1b1, Ahd4, and Nmo1 in murine skin tumors and adjacent normal epidermis by ligands of the aryl hydrocarbon receptor." *Mol Carcinog* 1998; 21(2): 135-146
- (165) Reiners-JJ,J.; Cantu,A.R.; Pavone,A.: "Modulation of constitutive cytochrome P-450 expression in vivo and in vitro in murine keratinocytes as a function of differentiation and extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(5): 1825-1829
- (166) RETTIE,A.E.; WILLIAMS,F.M.; RAWLINS,M.D.; Mayer,R.T.; Burke,M.D.: "Major differences between lung, skin and liver in the microsomal metabolism of homologous series of resorufin and coumarin ethers." *Biochemical Pharmacology* 1986; 35(20): 3495-3500
- (167) Roguet,R.; Cotovio,J.; Kremers,P.; Rougier,A.; Duteil,X.P.; Leclaire,J.: "Cytochrome P450-dependent enzyme activities and testosterone metabolism in a reconstituted human epidermis." *In Vitro Toxicology* 1995; 8: 97-104
- (168) Ross,M.H., Rohen,J.W., Lütjen-Drecoll,E., and Kaye,G.: "Atlas der Histologie - Mikroskopische Anatomie des Menschen";2. Auflage; Berlin, Wiesbaden: 1995
- (169) Ruckpaul,K.: "Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung?" *Pharmazie in unserer Zeit* 1993; 22(5-6): 296-304

- (170) Ruckpaul,K. and Rein,H.; "Basis and Mechanisms of Regulation of Cytochrome P-450"; *Frontiers in Biotransformation - Volume 1*; Berlin: Akademie-Verlag Berlin, 1989
- (171) Ruckpaul,K. and Rein,H.; "Principles, Mechanisms and Biological Consequences of Induction"; *Frontiers in Biotransformation - Volume 2*; Berlin: Akademie-Verlag Berlin, 1990
- (172) Ruckpaul,K. and Rein,H.; "Regulation and Control of Complex Biological Processes by Biotransformation"; *Frontiers in Biotransformation - Volume 9*; Berlin: Akademie Verlag GmbH, 1994
- (173) Ryan,D.E.; Thomas,P.E.; Levin,W.: "Hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with isosafrole. Purification and characterization of four enzymic forms." *Journal of Biological Chemistry* 1980; 255(16): 7941-7955
- (174) Sadar,M.D.; Ash,R.; Sundqvist,J.; Olsson,P.E.; Andersson,T.B.: "Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes." *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(30): 17635-17643
- (175) Sadek,C.M.; Allen-Hoffmann,B.L.: "Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics." *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(23): 16067-16074
- (176) Santana,E.; Peritz,A.E.; Iyer,S.; Uitto,J.; Yoon,K.: "Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial cells." *J Invest Dermatol* 1998; 111(6): 1172-1177
- (177) Sasaki,H.; Akamatsu,H.; Horio,T.: "Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT." *J Invest Dermatol* 2000; 114(3): 502-507
- (178) Schenkman,J.B. and Greim,H.; "Cytochrome P450"; *Handbook of Experimental Pharmacology - Volume 105*; Berlin, Heidelberg, N.Y., London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Sringer-Verlag, 1993
- (179) Schoop,V.M.; Mirancea,N.; Fusenig,N.: "Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts." *Journal of Investigative Dermatology* 1999; 112(3): 343-353
- (180) Schürer,N.Y.; Köhne,A.; Schliep,V.; Barlag,K.; Goerz,G.: "Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes." *Exp Dermatol* 1993; 2(4): 179-185
- (181) Schwarz,A.; Mahnke,K.; Luger,T.A.; Schwarz,T.: "Pentoxifylline reduces the formation of sunburn cells." *Exp Dermatol* 1997; 6(1): 1-5
- (182) Sesardic,D.; Pasanen,M.; Pelkonen,O.; Boobis,A.R.: "Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues." *Carcinogenesis* 1990; 11(7): 1183-1188
- (183) Shen,Z.; Wells,R.L.; Liu,J.; Elkind,M.M.: "Identification of a cytochrome P450 gene by reverse transcription--PCR using degenerate primers containing inosine." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 1993; 90(24): 11483-11487
- (184) Shimada,T.; Gillam,E.M.J.; Sutter,T.R.; Strickland,P.T.; Guengerich,F.P.; Yamazaki,H.: "Oxidation of Xenobiotics by Recombinant human Cytochrome P450 1B1." *Drug Metabolism and Disposition* 1997; 29(5): 617-622
- (185) Simpson,A.E.: "The cytochrome P450 4 (CYP4) family." *General Pharmacology* 1997; 28(3): 351-359
- (186) Slivka,S.R.: "Testosterone metabolism in an in vitro skin model." *Cell Biology and Toxicology* 1992; 8(4): 267-276
- (187) Sotaniemi,E.A.; Pelkonen,R.O.; Mokka,R.E.; Huttunen,R.; Viljakainen,E.: "Impairment of drug metabolism in patients with liver cancer." *European Journal of Clinical Investigation* 1977; 7(4): 269-274
- (188) Stark,H.J.: "Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation." *Journal of Investigative Dermatology* 1999; 112(5): 681-691
- (189) Stitzel,R.E.; Anders,M.W.; Mannering,G.J.: "Inhibition of drug metabolism. III.) Inhibition of Hexobarbital Metabolism in the Intact Rat and in the Isolated Perfused Liver by 2-Diethylaminoethyl 2,2-

- Diphenylvalerate HCl (SKF 525-A) and its N-Deethylated Derivatives." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1966; 2: 335-340
- (190) Stoddart,A.M.; Levine,W.G.: "Azoreduction of dimethylaminoazobenzene (DAB) in primary cultures of rat hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition* 1989; 18(1): 36-41
- (191) Stohs,S.J.; Grafstrom,R.C.; Burke,M.D.; Orrenius,S.: "Xenobiotic metabolism and enzyme induction in isolated rat intestinal microsomes." *Drug Metabolism and Disposition* 1976; 4(6): 517-521
- (192) Stormer,E.; von Moltke,L.L.; Shader,R.I.; Greenblatt,D.J.: "Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6, and 3A4." *Drug Metabolism and Disposition* 2000; 28(10): 1168-1175
- (193) Tateishi,T.; Watanabe,M.; Kumai,T.; Tanaka,M.; Moriya,H.; Yamaguchi,S. et al.: "CYP3A is responsible for N-dealkylation of haloperidol and bromperidol and oxidation of their reduced forms by human liver microsomes." *Life Sci* 2000; 67(24): 2913-2920
- (194) Ude,J. and Koch,M.; "Die Zelle - Atlas der Ultrastruktur"; Jena; Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag, 1994
- (195) Ullrich,V.: "Die Rolle des Cytochrom P450 bei der Aktivierung von Pharmaka. The role of cytochrome P450 in the activation of drugs." *Arzneimittelforschung* 1977; 27(9b): 1821-1827
- (196) Ullrich,V.; Weber,P.: "The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. A direct fluorometric test." *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1972; 353(7): 1171-1177
- (197) van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Ponc, M., Corsini, E., Barker, C., Fusenig, N., Liebsch, M., Benford, D., de Brugerolle de Fraissinette, A., and Fartasch, M.: "The Use of Human Keratinocytes and Human Skin Models for Predicting Skin Irritation." *ECVAM - European Centre for the Validation of Alternative Methods.*; 1997;27; 723-743. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 38
- (198) Vicanova,J.; Boelsma,E.; Mommaas,A.M.; Kempenaar,J.A.; Forslind,B.; Pallon,J. et al.: "Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation." *J Invest Dermatol* 1998; 111(1): 97-106
- (199) Vickers,A.E.M.; Jimenez,R.M.; Spaans,C.; Pflimlin,V.; Fisher,R.L.; Brendel,K.: "Human and Rat Lung Biotransformation of Cyclosporin a and its Derivatives using Slices and Bronchial Epithelial Cells." *Drug Metabolism and Disposition* 1997; 25(7): 873-880
- (200) Villard,P.H.; Sampol,E.; Elkaim,J.L.; Puyou,F.; Casanova,D.; Seree,E. et al.: "Increase of CYP1B1 Transcription in Human Keratinocytes and HaCaT Cells after UV-B Exposure." *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002; 178(3): 137-143
- (201) Vistica,D.T.; Skehan,P.; Scudiero,D.; Monks,A.; Pittman,A.; Boyd,M.R.: "Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production." *Cancer Research* 1991; 51(16): 2515-2520
- (202) von Moltke,L.L.; Greenblatt,D.J.; Granda,B.W.; Giancarlo,G.M.; Duan,S.X.; Daily,J.P. et al.: "Inhibition of human cytochrome P450 isoforms by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." *J Clin Pharmacol* 2001; 41(1): 85-91
- (203) Vondracek,M.; Xi,Z.; Larsson,P.; Baker,V.; Mace,K.; Pfeifer,A. et al.: "Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa." *Carcinogenesis* 2001; 22(3): 481-488
- (204) Wang,R.W.; Newton,D.J.; Scheri,T.D.; Lu,A.Y.H.: "Human Cytochrome P450 3A4-catalyzed Testosterone 6 $\beta$ -Hydroxylation and Erythromycin N-Demethylation." *Drug Metabolism and Disposition* 1997; 25(4): 502-507
- (205) Waxman,D.J.; Dannan,G.A.; Guengerich,F.P.: "Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes." *BIOCHEMISTRY* 1985; 24(16): 4409-4417

- (206) Waxman,D.J.; Lapenson,D.P.; Aoyama,T.; Gelboin,H.V.; Gonzalez,F.J.; Korzekawa,K.: "Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s." *Arch Biochem Biophys* 1991; 290(1): 160-166
- (207) Wei,Y.D.; Rannug,U.; Rannug,A.: "UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan." *Chemico-Biological-Interactions* 1999; 118(2): 127-140
- (208) West,S.B.; Huang,M.T.; Miwa,G.T.; Lu,A.Y.: "A simple and rapid procedure for the purification of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 from rat liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* 1979; 193(1): 42-50
- (209) Wollina,U.; Knoll,B.; Pruefer,K.; Barth,A.; Mueller,D.; Huschenbeck,J.: "Synthetic wound dressings-evaluation of interactions with epithelial and dermal cells in vitro." *Skin Pharmacology (and applied skin physiology)* 1996; 9(1): 35-42
- (210) Woolf,T.F.; "Handbook of Drug Metabolism"; New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 1999
- (211) Wortelboer,H.M.; de Kruif,C.A.; van Iersel,A.A.; Falke,H.E.; Noordhoek,J.; Blaauboer,B.J.: "Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures. The effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities." *Biochem Pharmacol* 1991; 42(2): 381-390
- (212) Yoshimura,R.; Kusunose,E.; Yokotami,N.; Yamamoto,S.; Kubota,I.; Kusunose,M.: "Purification and characterization of two forms of fatty acid  $\omega$ -hydroxylase cytochrome P-450 from rabbit kidney cortex microsomes." *J Biochem* 1990; 108: 544
- (213) Zetkin,M. and Schalsach,H.; "Wörterbuch der Medizin";15. Auflage; Berlin: Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, 1992
- (214) Zhengyin,Y.; Caldwell,G.W.: "Metabolism Profiling, and Cytochrome P450 Inhibition and Induction in Drug Discovery." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1: 403-425

<p>2-<math>\alpha</math>-OH-Testosteron</p>		<p>DAB</p>	
<p>3- MC</p>		<p>Dexa-methason</p>	
<p>4-Androsten-3,17-Dion</p>		<p>Metyrapon</p>	
<p>4-(N,N-Dimethyl-amino)anilin</p>		<p>MTT</p>	
<p>6-<math>\beta</math>-OH-Testosteron</p>		<p>Pheno-barbital</p>	
<p>7- EC</p>		<p>Proadifen</p>	
<p>7- ER</p>		<p>Resorufin</p>	

<p>7- HC</p>		<p>Rifampicin</p>	
<p><math>\alpha</math>-NP</p>		<p>TAO</p>	
<p>Clofibrat</p>		<p>Testosteron</p>	

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis Biochemische Pharmazie des Institutes für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Ich danke Herrn Professor Dr. habil. A. Langner für die Bereitstellung des interessanten Themas und die konstruktiven Anregungen während der Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. habil. M. Brandsch und seiner Arbeitsgruppe für die Einführung in die Zellkulturtechnik.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Langner, insbesondere Frau Munk, danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor, die ständige Hilfsbereitschaft und die motivierenden Gedankenaustausche, die zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H.-H. Rüttinger danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit bei den Aufnahmen der Extinktionsspektren und die Überlassung des Spekols und der UV-Bestrahlungskammer.

Herrn Holger Schmidt danke ich für seine Unterstützung im Labor bei der Durchführung der Ethoxycoumarin- Deethylierungs- Versuche.

Frau Diplom-Pharmazeutin Andrea Dietrich danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit während der Anfertigung ihrer Diplomarbeit und für ihre dabei gewonnen Ergebnisse.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die verständnisvolle Unterstützung während der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit.

## Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Name: Ute Kürschner  
Geboren am: 19.08.1972 in Karl-Marx-Stadt  
Eltern: Günter und Annerose Kürschner  
Kind: Marian Kürschner, geb.: 23.02.2004

**Schulausbildung:** 09/1979-08/1989 POS Gornau  
09/1990-08/1993 Abendgymnasium Chemnitz  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife außer Geographie

**Berufsausbildung:** 09/1989-03/1993 Feldschlößchen- Brauerei GmbH Chemnitz  
Abschluss: Chemielaborantin

**Studium:** 10/1993-09/1997 Pharmazie an der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg  
Abschlüsse: 09/1995 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
09/1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

**Diplom:** 10/1997-03/1998 Institut für Pharmazeutische Chemie, Fachbereich Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg  
Abschluss: Diplompharmazeut

**Pharmazeutisches Praktikum:** 05/1998-10/1998 Schiller-Apotheke Hamburg- Altona  
01/1999 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

**Approbation als Apothekerin:** 02/1999

**Berufstätigkeit:** 02/1999-03/1999 Ring-Apotheke Dessau, Arbeit als Apothekerin  
04/1999-10/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Fachbereiches Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg, Promotionsstudium am Institut Pharmazeutische Chemie  
währenddessen Vertretung als Apothekerin:  
09/1999-12/1999 Stephanus-Apotheke Halle  
01/2000-02/2000 Charlotten-Apotheke Halle  
03/2000-10/2005 Apotheke im Magistralen-Carré Halle  
seit 10/2005 Galenus- Apotheke Halle

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ute Kürschner

Halle/Saale, im November 2007