



Gentechnologisch konstruierte V79 Zelllinien in Kombination mit chemisch-analytischen Verfahren als Ersatz und Ergänzung zu Tierversuchen

Johannes Doehmer¹ und Jürgen Jacob²

¹ Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München, D-München

² Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, D-Großhansdorf

Zusammenfassung

Seit 1986 werden V79 Zellen des Chinesischen Hamsters auf gentechnologischem Wege mit Enzymen von Ratte und Mensch ausgestattet, um vom Metabolismus abhängige Effekte in der Toxikologie und Pharmakologie unter definierten Bedingungen untersuchen zu können. In der Toxikologie geht es um die metabolische Aktivierung von Schadstoffen und die Prüfung der entstehenden Metaboliten hinsichtlich ihrer Toxizität. In der Pharmakologie interessiert der Ab- und Umbau von Arzneimitteln, was entscheidenden Einfluß auf deren Wirksamkeit haben kann. Am Beispiel der metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zu Mutagenen und Kanzerogenen wird der Vorteil gentechnologisch konstruierter Zellen gegenüber Tierversuchen deutlich, wenn es um spezielle Fragestellungen geht. Vergleichende Untersuchungen an V79 Zellen mit Expression von Enzymen der Ratte und des Menschen führten zu erheblichen Spezies-spezifischen Unterschieden im Metaboliten-Profil, die eine besondere Gefährdung des Menschen im Falle der Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen nahelegen. Gleichzeitig wird damit gezeigt, daß an der Ratte gewonnene Ergebnisse als Grundlage einer Risiko-Einschätzung für den Menschen mit Vorsicht zu beurteilen sind.

Summary: Genetically engineered V79 cell lines in combination with analytical-chemical procedures for replacing and refining animal experimentations

Since 1986 V79 Chinese hamster cells are being genetically engineered for rat and human enzymes for studies on metabolism dependent effects in toxicology and pharmacology under defined conditions. The metabolic activation of potentially harmful chemicals is of interest in toxicology, because metabolites may have their own toxic potency. Anabolic and catabolic pathways of drugs are of interest in pharmacology, because metabolism has a decisive impact on the efficacy of drugs. As an example for the usefulness of V79 cells genetically engineered for metabolic competence, and their advantage over animal experimentation, metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons has been studied. Comparative studies using V79 cells expressing rat and human enzymes revealed striking differences in the metabolite profile, which made evident, that human beings are at more risk than the rat, when exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. This suggests at the same time, that results obtained from animal experimentation are to be treated with caution, if they form the basis for risk assessment.

Keywords: V79 cells, cytochromes P450, xenobiotics

Einleitung

Es bedarf analytischer Werkzeuge, um komplexe biologische Vorgänge im Detail zu verstehen. Ein außerordentlich komplexes biologisches Geschehen ist die Biotransformation. Darunter werden Stoffwechselvorgänge zusammengefaßt, die Organismen evolutiv entwickelt haben, um sich gegen Fremdstoffe aus der Umwelt zu schützen. Unter „Fremdstoffe“ werden Schadstoffe verstanden, die beispielsweise in der Luft oder in Nahrungsbestandteilen und Genußmitteln enthalten sein können. Derartige Schadstoffe können sich aus Verbrennungsprozessen ergeben, wie etwa in der Kohleheizung, der Müllverbrennung, im Zigarettenrauch, aus Abgasen von Verbrennungsmotoren, bei der Koks- und Stahlherstellung, aber auch aus vulkanischer Tätigkeit. Natürlicherweise entstehen Schadstoffe auch in Pilzen und Pflanzen, die als Nahrungsmittel konsumiert werden. Arzneimittel werden ebenfalls unter Fremdstoffen geführt und unterliegen den gleichen physiologischen Stoffwechselvorgängen wie Schadstoffe.

Problemstellung

Der Umgang mit Fremdstoffen ist grundsätzlich unvermeidbar. Es stellt sich die Frage, wieviel Fremdstoff tolerabel ist. Das heißt, wieviel Risiko im Umgang mit Fremdstoffen

sind wir bereit einzugehen. Um eine derartige Situation beurteilen zu können, müssen eine Reihe grundlegender Kenntnisse über einen Schadstoff und seine Wirkung erarbeitet werden. Das bedeutet im einzelnen, daß ein Schadstoff identifiziert und in seinem chemischem Aufbau bekannt sein muß. Weiterhin bedeutet es, daß der Weg, auf dem ein Fremdstoff aufgenommen wird, erkannt wird. Dieser bestimmt, auf welches Organ ein Fremdstoff trifft, etwa auf die Lunge bei Inhalation oder auf die Leber bei oraler Aufnahme. Enzyme in diesen Organen wiederum verstoffwechseln den Fremdstoff, um ihn in eine ausscheidbare Verbindung umzuwandeln, die den Körper entweder über die Niere mit dem Harn oder über die Gallenflüssigkeit im Kot verlassen kann. Bei diesem Prozeß ist es wichtig, die Zwischenprodukte zu identifizieren, da sie eine eigene Wirkung haben können, die der ursprünglich aufgenommene Fremdstoff nicht besitzt. Es ist also eine Vielfalt von Fragen zu klären, bevor ein Risiko im Umgang mit Fremdstoffen beurteilt werden kann. Die Klärung dieser Fragen ist die vornehmste Aufgabe der Toxikologie. Die Entwicklung und Anwendung von chemischen und biologischen Methoden und Verfahren ist dabei von grundlegender Bedeutung. Damit hat sich die Toxikologie zu einer Wissenschaft entwickelt, die sich grundlegend von einer Toxikologie unterscheidet, die die Wirkung eines Fremdstoffes durch „Titration auf Umfallen“ beschreibt, wie bei der Ermittlung der 50%igen letalen Dosis (LD_{50}). Es ist naheliegend, daß es subtilerer Verfahren bedarf, um die oben genannten Fragestellungen hinreichend befriedigend zu beantworten.

Insbesondere die Entwicklung von *in vitro* Verfahren erlaubt eine analytische Vorgehensweise bei der Lösung von Problemen. An diesem Punkt treffen sich zwei Entwicklungen, die als gemeinsames Ziel den Ersatz von Tierversuchen anstreben, einmal aus rein wissenschaftlichen und methodischen, zum anderen aus

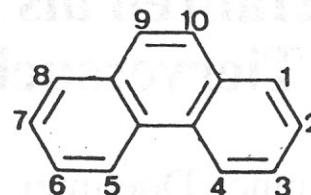
ethischen Gründen. Damit hat der Ersatz von Tierversuchen eine gesellschaftliche Bedeutung erlangt, die in besonderer Weise eine Förderung durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT), und Organisationen wie die der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen (ZEBET) beim Bundesgesundheitsamt bewirkte.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

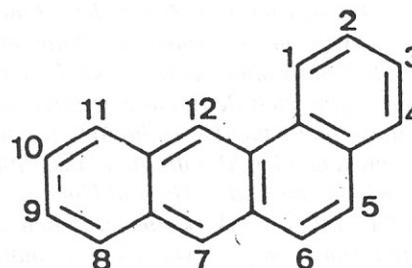
Die zuvor allgemein dargestellte Problematik der Fremdstoffe und ihre Wirkungen auf Mensch und Tier soll im folgenden am konkreten Beispiel der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe erläutert werden.

Seit etwa 200 Jahren ist bekannt, daß Bestandteile aus Steinkohlenruß bestimmte Formen von Tumoren verursachen können. Schon im 18. Jahrhundert wurde in England der „Schornsteinfeger-Krebs“ beschrieben, eine bestimmte Form des Hodentumors. Erst zu Beginn dieses Jahrhunderts gelang der Nachweis eines Tumor verursachenden Stoffes im Ruß, das Dibenz[*a,h*]anthracen. Etwas später wurde das Benzo[*a*]pyren isoliert und seine Tumor auslösende Wirkung beschrieben. Beide Substanzen gehören zur Klasse der „Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen“ (Abbildung 1), die häufig als PAK abgekürzt werden. Hinsichtlich ihrer Tumor-induzierenden Wirkung fiel auf, daß PAKs mit weniger als vier Ringen eine nur sehr geringe oder überhaupt keine tumorigene Wirkung besitzen. Die Wirkungen von PAKs mit vier und mehr Ringen differieren allerdings derartig, daß aus der Anzahl der Ringe nicht auf die Tumor induzierende Wirkung geschlossen werden kann. Auch sind es nicht die PAKs als solche, sondern bestimmte Stoffwechselprodukte der PAKs, die sich aus den PAKs in der Lunge oder Leber bilden und die die Tumor

PHENANTHREN



BENZ[*a*]ANTHRACEN



BENZO[*a*]PYREN

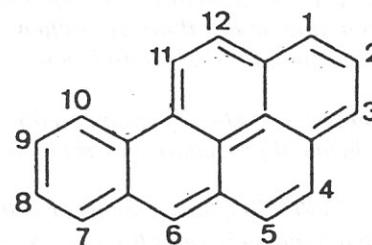


Abbildung 1: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

induzierende Wirkung besitzen. Ein mittlerweile klassisches Beispiel ist die metabolische Aktivierung des Benzo[*a*]pyrens zum ultimalen Tumor-induzierenden Metaboliten, dem 7,8-Diol-9,10-Epoxid des Benzo[*a*]pyrens, als eines von vielen verschiedenen Abbauprodukten des Benzo[*a*]pyrens.

Da PAKs allgemein verbreitet sind und sowohl in Luft, Wasser und

Nahrung enthalten sein können, ist eine toxikologische Bewertung nicht nur bei beruflich bedingter Exposition, sondern von allgemeiner Bedeutung.

Die metabolische Aktivierung von PAKs zu ultimalen Kanzerogenen ist ein Enzym-vermittelter oxidativer Prozess. Die Schlüsselenzyme dieser Prozesse sind Cytochrome P450. Ein grundlegendes Verständnis dieser Aktivierung setzt voraus, daß die metabolisch kompetente Form der Cytochrome P450 bekannt ist und die Metaboliten identifiziert werden. Zur Klärung dieser Probleme wurden von uns und unseren Kollegen *in vitro* Systeme entwickelt und eingesetzt. Zum einen handelt es sich um kultivierte Zellen, denen durch ein gentechnologisches Verfahren die Eigenschaft zur Metabolisierung von PAKs verliehen wurde. Zum anderen sind es moderne analytisch-chemische Verfahren zum empfindlichen Nachweis von PAKs und Metaboliten sowie ihrer Identifizierung. Beide *in vitro* Systeme ergänzen sich in ihren Eigenschaften und Möglichkeiten derartig, daß die *in vivo* Situation im Detail verstanden werden kann.

Gentechnologisch modifizierte V79 Zellen des Chinesischen Hamsters

Seit etwa 30 Jahren existieren Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters als permanente Zelllinie V79. Besondere Eigenschaften haben diese Zelllinie zu einem bevorzugten Testsystem in der Toxikologie werden lassen. Zu diesen Eigenschaften gehören ein außerordentlich schnelles Wachstum, geringe Bedürftigkeit an Kulturmedium, ein stabiler und nahezu diploider Karyotyp, ein leicht testbares Marker-Gen „HPRT“ auf dem einzelnen X-Chromosom. Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese Zellen hervorragend geeignet, um Fremdstoffe auf zytotoxische und mutagene Wirkungen und chromosomale Defekte hin zu testen. Allerdings sind diese Zel-

len defizient für Cytochrome P450. Seit der Entwicklung gentechnologischer Verfahren zur Isolierung von Genen und dem Transfer dieser Gene, lassen sich kultivierte Zellen mit neuartigen Eigenschaften ausstatten, so auch für die Expression bestimmter Cytochrome P450 und dadurch mit der Fähigkeit, Fremdstoffe metabolisch zu aktivieren. Aufgrund der Defizienz der Ausgangszelllinie sind die gentechnologisch veränderten Zellen durch das übertragene Cytochrom P450 definiert. Daraus ergibt sich ein gewaltiger Vorteil gegenüber komplexen *in vivo* Systemen, die eine Vielzahl von Cytochromen P450 exprimieren und dadurch eine eindeutige Zuordnung von Metaboliten zu einzelnen Cytochromen P450 zumindest erschweren. Das Konzept zur gentechnologischen Entwicklung einer Testbatterie für Cytochrome P450 wurde von Doehmer seit 1986 entwickelt und ausgebaut (Doehmer, 1993). Daß gentechnologisch konstruierte V79 Zellen funktionieren, wurde zunächst an Cytochromen P450 der Ratte demonstriert (Doehmer et al., 1988). Eine Reihe von vergleichenden Untersuchungen belegte, daß die klonierten Cytochrome P450-Formen der Ratte in den V79 Zellen wie *in vivo* und wie die biochemisch gereinigten Formen funktionierten (Platt et al., 1989; Waxman et al., 1989). Nachdem somit die Funktionalität des Systems im Prinzip erwiesen war, wurden seit 1990 V79 Zellen auch mit Cytochrome P450-Formen des Menschen ausgestattet (Wölfel et al., 1992). Unter den bislang konstruierten Zelllinien sind auch solche, die Cytochrome P450 produzieren, die besonders PAKs metabolisch aktivieren und ultimale Kanzerogene und Mutagene bilden können. Dies sind insbesondere die Cytochrome P450-Formen 1A1 (Dogra et al., 1990; Schmalix et al., 1993) und 1A2 (Wölfel et al., 1991; Wölfel et al., 1992). Beide Formen existieren sowohl als Ratten- und Menschen-Cytochrome P450 in V79 Zelllinien, die wir entsprechend ihrer jeweils exprimierten Cytochrome

P450-Form V79MZh1A1, V79MZh1A2, V79MZr1A1 und V79MZr1A2 genannt haben (Schmalix et al., 1993). An diesen Zellen lassen sich Cytochrome P450 abhängige toxische Eigenschaften der PAKs testen. Humanes Cytochrome P450 1A1 wird besonders in der Lunge und erheblich weniger in der Leber exprimiert und unterscheidet sich dadurch vom Cytochrome P450 1A1 der Ratte. Die Expression in der Lunge bringt es aber mit sich, daß die Reinigung und Isolierung des humanen Cytochroms P450 1A1 auf klassischem biochemischem Wege außerordentlich mühevoll und quantitativ unzureichend ist. Die Klonierung und Expression humaner Gene, insbesondere dasjenige des Cytochroms P450 1A1, erlaubt daher erstmals Untersuchungen, deren Ergebnisse für den Menschen relevant und sich unter Umständen von denen an der Ratten-Cytochrome P450-Form erzielten Ergebnisse unterscheiden können.

Nachweis von PAKs und Metaboliten durch analytisch-chemische Verfahren

Für den analytischen Nachweis von Metaboliten stehen in der Kapillargas-Chromatographie (GC) und der Hochleistungsflüssigkeit-Chromatographie (HPLC) zwei hochauflösende chromatographische Trenntechniken zur Verfügung (Jacob et al., 1980; Jacob et al., 1981a). Die Metaboliten werden wie bei anderen Proben üblich auch nach *in vitro* Inkubationen mit den Cytochrome P450 exprimierenden V79 Zellen nach Stoppen der Enzymaktivität durch Zugabe von Aceton mit Lösungsmitteln extrahiert und durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex gereinigt. Aus diesen angereicherten Extrakten können einzelne Metaboliten nach GC- und/oder HPLC-Verfahren voneinander getrennt werden (Jacob et al., 1981b; Jacob et al., 1982; Jacob et al., 1992). Ihr Nachweis erfolgt im HPLC-Verfahren mittels UV- oder Fluoreszenz spektrometrischen Verfahren, bzw. durch

thermische Ionisationsdetektoren oder mit Hilfe der hochempfindlichen Massenspektrometrie. Derartige Detektoren erlauben noch den Nachweis einzelner Stoffe im Sub-Nanogramm-Bereich ($1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$) (Jacob et al., 1981a; Jacob et al., 1982). In Abbildung 2 ist das Ergebnis einer Inkubation des schwach krebserregenden Benz[a]anthracens mit V79MZr1A1-Zellen dargestellt, wobei hier das HPLC-Verfahren eingesetzt wurde. Da für die quantitative Bestimmung einzelner Komponenten unterschiedliche Signalfaktoren verwendet werden müssen, sind die in der Abbildung 2 wiedergegebenen Signalflächen nicht direkt vergleichbar. Die qualitative Auswertung zeigt aber, daß durch das humane Cytochrom P450 1A1 das Benz[a]anthracen sowohl in der 3,4-, als auch in der 8,9- sowie im geringeren Maße in der 5,6-Position oxidiert wird, daß aber auch eine gleichzeitige oder nachfolgende Oxidation in der 8,9- und der 10,11-Position erfolgt, was sich aus der Entstehung des 8,9,10,11-Tetrols herleiten läßt. Mit den Ratten-Cytochrome P450 1A1 exprimierenden V79MZr1A1-Zellen wurden dagegen andere Metabolitenprofile erhalten. Ähnliches gilt für andere PAKs

in den jeweiligen Spezies-spezifisch exprimierenden Cytochrom P450 V79-Zellen.

Aktuelle Ergebnisse aus der kombinierten Anwendung von V79 Zelllinien und analytisch-chemischen Verfahren

Die kombinierte Anwendung unserer Systeme und Verfahren begann mit Untersuchungen zur Cytochrome P450 vermittelten metabolischen Aktivierung der PAKs Phenanthren, Benz[a]anthracen und Benzo[a]pyren (Abbildung 1). Hierzu wurden die verschiedenen V79 Zellen für zwei Tage in Gegenwart dieser PAKs kultiviert, in Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$, bei denen noch wenig Zytotoxizität beobachtet wird. Nach zweitägiger Inkubation wurde das überstehende Kulturmedium auf die Anwesenheit von PAK-Metaboliten mittels GC/MS geprüft und ein Metabolitenprofil für die verschiedenen Cytochrome P450 erstellt.

Beispielhaft sei ein Metabolitenprofil für das Benzo[a]pyren in Abbildung 3 dargestellt. Auffallend und überraschend war die nahezu ausschließliche Oxidation in der

7,8,9,10-Position durch das Cytochrome P450 1A1 des Menschen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit zur Bildung des *ultimalen* Kanzerogens höher als im Fall des Cytochroms P450 1A1 der Ratte. Dies zeigt sich auch in einer vergleichenden Zytotoxizitäts-Studie an den verschiedenen V79 Zelllinien (Abbildung 6). Benzo[a]pyren ist in der Zelllinie mit Cytochrome P450 1A1 des Menschen zytotoxischer als in der Zelllinie mit Cytochrome P450 1A1 der Ratte (Abbildung 6). Dies legt zumindest nahe, daß die im Tierversuch an Ratten gewonnenen Ergebnisse zur Kanzerogenität von PAKs nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Hinzu kommt die Lungen-spezifische Expression des Cytochroms P450 1A1 beim Menschen. Metabolitenprofil und Lungen-spezifische Expression legen eine besondere Gefährdung des Menschen im Vergleich zur Ratte nahe, etwa durch Zigaretten-Rauchen. In der Tat belegen epidemiologische Befunde in verschiedenen Ländern, daß ein Anstieg des Zigaretten-Konsums zu einem um etwa 10 Jahre zeitlich versetzten Anstieg des Lungenkrebs führt.

Phenanthren und seine Metaboliten – ein PAK mit weniger als vier Ringen – sind weder zytotoxisch, noch kanzerogen, noch mutagen. Trotzdem ist dieser PAK von praktischer Bedeutung im Bio-Monitoring, etwa beruflich exponierter Personen. Im Vergleich zu anderen PAKs werden Phenanthren und Metaboliten leicht und in hohen Konzentrationen ausgeschieden, so daß sie ohne analytische Probleme im Harn nachweisbar sind. Diese PAKs sind daher von diagnostischem Wert und repräsentativ für eine allgemeine Exposition gegenüber PAKs. Auch in diesem Fall zeigten sich deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil von Ratte- und Mensch-Cytochrome P450 1A1 (Abbildung 4) und 1A2 (Abbildung 5). Wie im Falle des Benzo[a]pyrens können daher an der Ratte gewonnene Metabolitenprofile ebenfalls nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden.

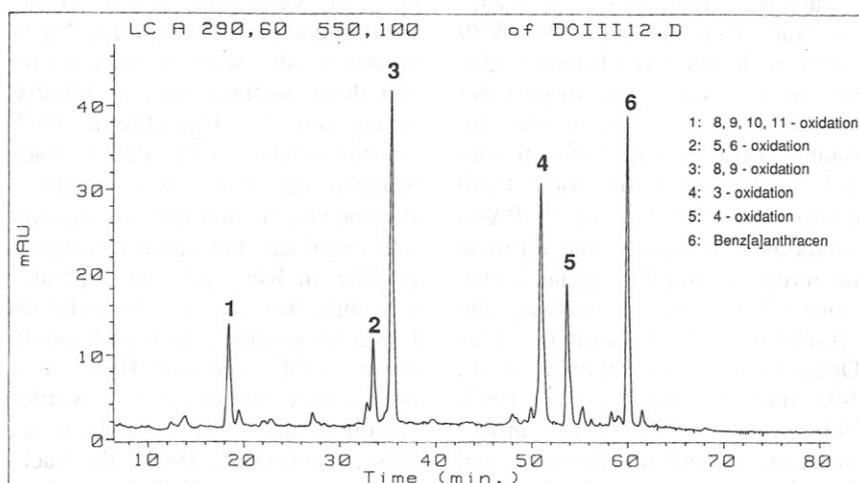


Abbildung 2: Chromatogramm der oxidierten Produkte des Benz[a]anthracens nach Metabolisierung in gentechnologisch konstruierten V79 Zellen.

Diskussion und zukünftige Entwicklungen

Der Wert eines *in vitro* Systems läßt sich daran messen, ob seine Eigenschaften es erlauben, eine bestimmte experimentelle Frage zu beantworten. Nur dann sind *in vitro* Systeme hilfreich. Ungenügend charakterisierte Systeme oder eine der Fragestellung nicht entsprechende Auswahl eines Systems führen zu irrelevanten oder sogar falschen Aussagen. Im Umgang mit *in vitro* Systemen ist es daher wichtig, sich über die Nach- und Vorteile eines jeweiligen Systems bewußt zu sein. Das „ultimale“ *in vitro* System wird und kann es nicht geben. Denkbar ist aber eine kombinierte Anwendung verschiedener Systeme, um deren Vor- und Nachteile gegeneinander kompensieren zu können. Vergleichend läßt sich das an frisch isolierten Leberzellen und an den hier beschriebenen gentechnologisch konstruierten Zellkulturen verdeutlichen. Im Umgang mit frisch aus einem Organ gewonnenen Zellen ist es nicht vermeidbar, daß die isolierten Zellen Differenzierungseigenschaften verlieren. So nimmt in frisch präparierten Leberzellen der Gesamtgehalt an Cytochromen P450 drastisch ab. Dies geschieht aber für die einzelnen Formen in unterschiedlichem Maße, so daß sich auch das Enzymprofil in frisch präparierten Leberzellen unkontrollierbar und ständig ändert (Rogiers et al., 1990). Unter diesen Bedingungen ist es naturgemäß schwierig, quantitative Ergebnisse zu gewinnen, wie sie am gereinigten Cytochrome P450 oder an gentechnologisch konstruierten Cytochrome P450 exprimierenden Zellen möglich sind. Andererseits exprimieren gerade frisch isolierte Leberzellen noch eine Vielzahl von Cytochromen P450, sodaß daran qualitativ geklärt werden kann, ob ein Fremdstoff metabolisiert wird. Indirekte Verfahren der Induktion durch Chemikalien oder Inhibition durch Antikörper erlauben zumeist auch, Hinweise auf die metabolisch kompetente Cytochrome P450-Form

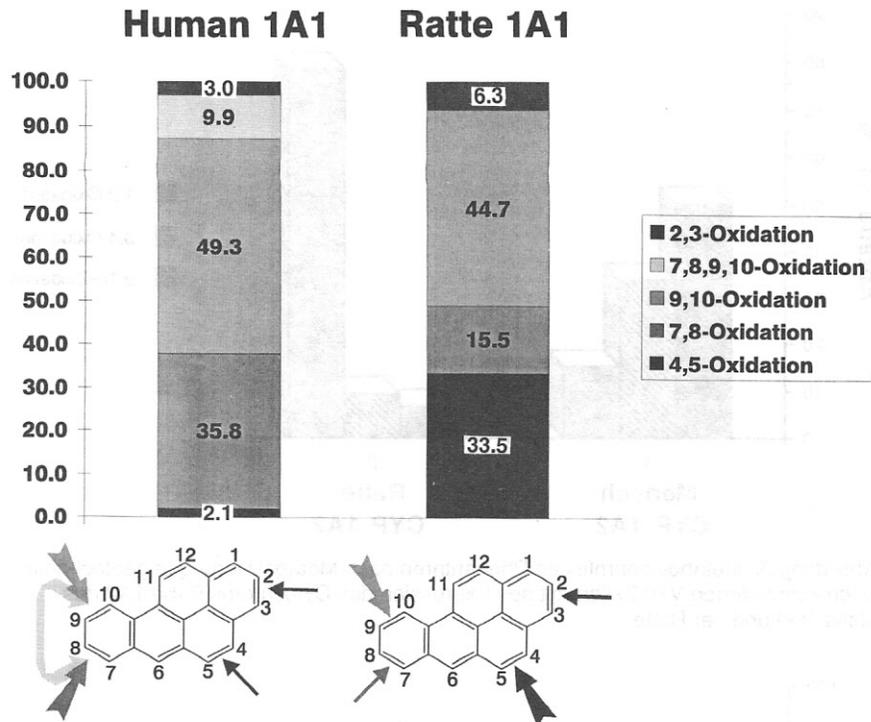


Abbildung 3: Oxidationsprodukte des Benzo[a]pyrens aus einer Cytochrom P450 1A1 abhängigen Reaktion bei Mensch und Ratte. Deutlicher Unterschied bei der Oxidation in der 4,5-Position, die beim Menschen Cytochrom P450 1A1 nahezu fehlt, dafür bevorzugte Oxidation in der 7,8,9,10-Position durch das Cytochrom P450 1A1 des Menschen und damit größere Wahrscheinlichkeit zur Bildung des ultimal kanzerogenen Metaboliten aus Benzo[a]pyren.

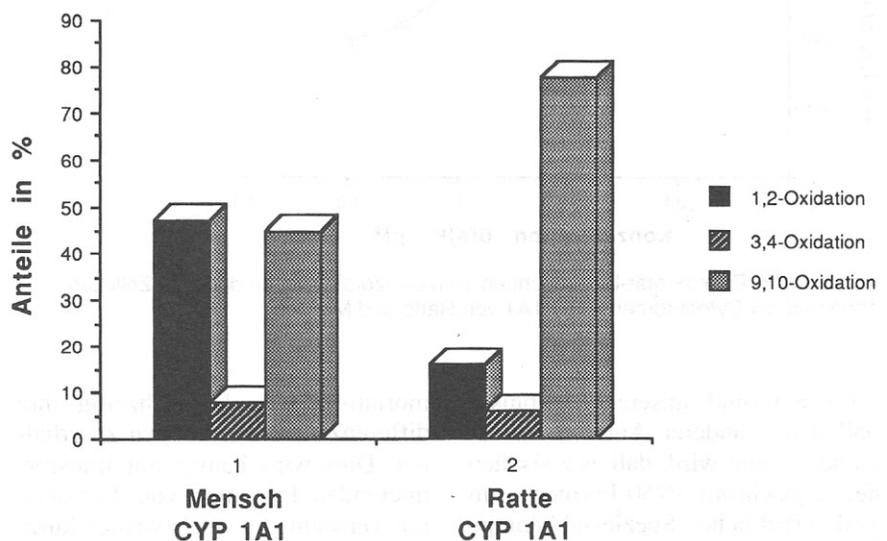


Abbildung 4: Metabolitenprofil des Phenanthren nach Metabolisierung in gentechnologisch konstruierten V79 Zellen mit des Expression des Cytochroms P450 1A1 des Menschen und der Ratte.

zu erzielen. Mit dieser Information lassen sich dann andere *in vitro* Systeme erfolgreich einsetzen, um mehr quantitative Ergebnisse zu ge-

winnen, wie sie mit Leberzellen, beispielsweise wegen begrenzter Lebensfähigkeit in Kultur, nicht erzielt werden können.

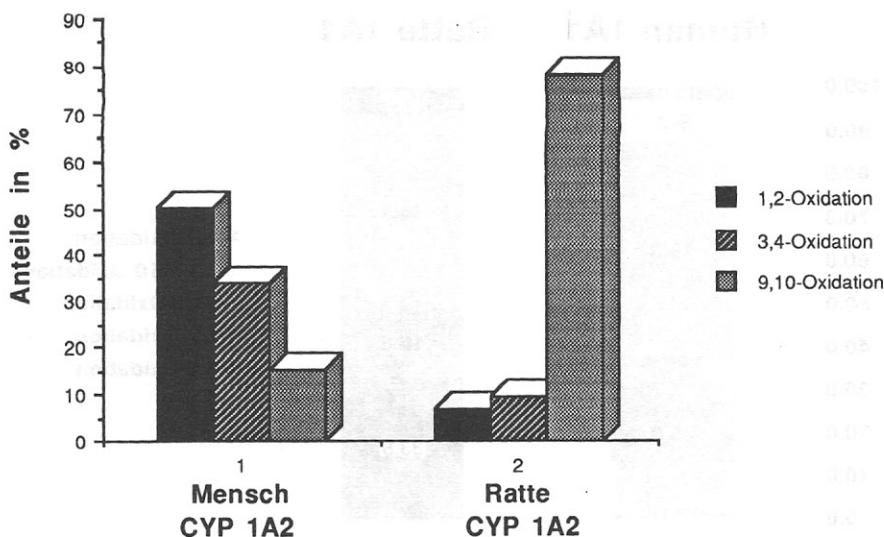


Abbildung 5: Metabolitenprofil des Phenanthren nach Metabolisierung in gentechnologisch konstruierten V79 Zellen mit des Expression des Cytochroms P450 1A2 des Menschen und der Ratte.

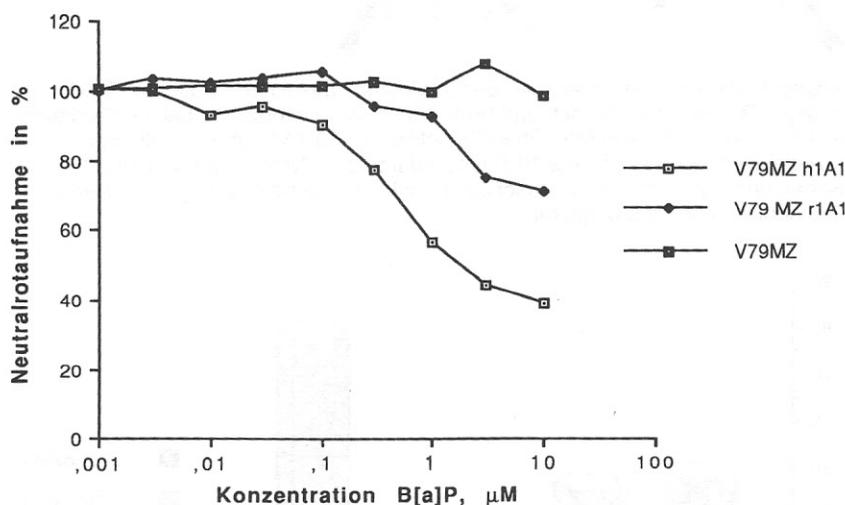


Abbildung 6: Zytotoxizität-Untersuchung zum Benzo[a]pyren an den V79 Zelllinien ohne und mit Cytochromen P450 1A1 von Ratte und Mensch.

Da aufgrund unserer Ergebnisse und denen anderer Autoren zunehmend erkannt wird, daß es zwischen den Cytochrom P450-Formen zum Teil erhebliche Spezies-abhängige Unterschiede geben kann, wird besonderer Wert auf die Kultivierung humaner Leberzellen gelegt. Allerdings ist es mit erheblichen Problemen verbunden, in genügender Menge qualitativ hochwertiges Organmaterial zu bekommen. Es gibt daher experimentelle Bestrebungen, frisch isolierte humane Leberzellen zu im-

mortalisieren und gleichzeitig ihre differenzierten Funktionen zu erhalten. Dies wird häufig mit transformierenden Proteinen von Tumoren versucht. So auch wieder kürzlich mit dem sogenannten Large T-Antigen des DNA-Tumovirus SV40 (Pfeifer et al., 1993). Allerdings war diesen Versuchen wenig Erfolg beschieden. Es gelingt zwar, frisch isolierte Leberzellen zu immortalisieren, aber um den Preis des Verlusts von differenzierten Funktionen, so auch der Cytochrome P450, die in

diesen Zellen weder auf RNA- noch auf Proteinebene nachweisbar waren. Das zentrale Problem in diesen Ansätzen ist es, Wachstum und Differenzierung gleichzeitig zu erhalten. Solange dies gegenläufige Prozesse sind, deren molekularbiologische Regulation nur im Ansatz verstanden ist, lassen sich auch frisch isolierte Leberzellen nicht in gewünschte Richtungen hin kontrolliert verändern.

Die Bewertung eines *in vitro* Systems bedarf einer kritischen Prüfung seiner Eigenschaften auf seine Anwendbarkeit hin. Wenn es um den Ersatz von Tierversuchen geht, geschieht dies leider häufig unter ideologischen Vorgaben. Tierversuche kann nur dasjenige *in vitro* System ersetzen, das auch wissenschaftlich bestehen kann. Die Entwicklung eines *in vitro* Systems sollte daher am zu lösenden Problem orientiert sein und nicht an dem dafür eingesetzten Tierversuch. Unter dieser Voraussetzung ist es möglich, daß ein *in vitro* System einen Tierversuch nicht nur ersetzen, sondern ihm auch überlegen sein kann, wie an den hier dargestellten Beispielen gezeigt wird. Doch es bedarf komplexer Technologie, um *in vitro* Systeme zu entwickeln.

Es ist eine Frage der Zeit, welche Technologien gerade zur Verfügung stehen. Gentechnologie ist eine sehr junge Technologie mit einem großen Potential für noch nicht genutzte oder erkannte Möglichkeiten zur Entwicklung von *in vitro* Systemen. Auf dem Gebiet der chemisch-analytischen Nachweisverfahren sind rasante Entwicklungen im Gange. Aber bei allen zur Verfügung stehenden Möglichkeiten sollte niemals außer acht gelassen werden, daß *per definitionem in vitro* Systeme immer nur analytische Werkzeuge sein können, um die *in vivo* Situation zu verstehen und partiell nachzustellen. Der experimentelle Charakter und Anspruch im Ansatz zur Entwicklung eines *in vitro* Systems hat und kann nicht die komplette Nachbildung der *in vivo* Situation zum Ziel haben. Es wäre ein fundamentales

und irreführendes Mißverständnis und ein nicht zu erfüllender Anspruch, wenn die Nachbildung der *in vivo* Situation durch ein *in vitro* System verlangt oder vorgetäuscht würde. Dies wird an Formulierungen erkennbar wie „*quasi in vivo*“ oder „so gut wie *in vivo*“ oder „*quasi human cells*“ oder „*humanised cells*“, denen man hie und da in Veröffentlichungen und Sachanträgen begegnet. Denkbar und machbar ist es allerdings, *in vitro* Systeme mit verschiedenen Graden der Komplexität auszustatten, wenn es beispielsweise um das Zusammenspiel mehrerer Enzyme in der Metabolisierung von Fremdstoffen geht. Aber selbst in diesem Fall sind es experimentell konstruierte und definierte Situationen, die die *in vivo* Situation in ihrer Gesamtheit nicht wiedergeben können und auch nicht sollen.

Danksagung

Das Projekt zur metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Die Entwicklung der V79 Zellkulturen wurde anfänglich durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 302 „Kontrollfaktoren der Tumorentstehung“ in Mainz finanziert und konnte durch eine großzügige Förderung von ZEBET/BGA in München fortgesetzt werden. Wir sind unseren Kollegen Dietrich Holtkamp, Gottfried Raab, Wolfgang Schmalix und Volker Soballa dankbar für ihre engagierte Mitarbeit im Projekt zur metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen.

Literatur

Doehmer, J. (1993). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology* 82, 105–118.

- Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H.R. und Oesch, F. (1988). Stable expression of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5769–5773.
- Dogra, S., Doehmer, J., Glatt, H.R., Mölders, H., Siebert, P., Friedberg, T., Seidel, A. und Oesch, F. (1990). Stable expression of rat cytochrome P-450IA1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their use in mutagenicity testing. *Molecular Pharmacology* 37, 608–613.
- Jacob, J., Grimmer, G. und Schmoldt, A. (1980). Gaschromatographic profile analysis of PAH-metabolites from rat liver microsomes and cells in culture. In A. Bjorseth und A.J. Dennis (Hrsg.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons* (807–817). Columbus/Ohio: Batelle Press.
- Jacob, J., Schmoldt und A. Grimmer, G. (1981a). Glass Capillary gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) data of mono- and polyhydroxylated benz[a]anthracene. Comparison with benz[a]anthracene metabolites from rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 362, 1021–1030.
- Jacob, H., Schmoldt, A. und Grimmer, G. (1981b). The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) as inducers of monooxygenases on the metabolite profile of benz[a]anthracene in rat liver microsomes. *Cancer Lett.* 14, 175–185.
- Jacob, J., Schmoldt, A. und Grimmer, G. (1982). Influence of monooxygenase inducers on the metabolic profile of phenanthrene in rat liver microsomes. *Toxicology* 25, 333–345.
- Jacob, J., Grimmer, G., Raab, G., Emura, M. und Mohr, U. (1990). Metabolism of pyrene and chrysene in epithelial human bronchial and hamster lung cells. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38, 221–230.
- Jacob, J., Grimmer, G., Mohr, U., Emura, M., Riebe-Imre und M., Raab, G. (1992). The metabolism of chrysene and benzo[a]pyrene in hamster, rat and human lung cells in culture. In: N.H. Seemayer und W. Hadnag (Hrsg.), *Environmental Hygiene III*, (87–90). Berlin: Springer.
- Pfeifer, A.M.A., Cole, K.E., Smoot, D.T., Weston, A., Groopman, J.D., Shields, P. G., Vignaud, J.-M., Juillerat, M., Lipsky, M. M., Trump, B. F., Lechner, J. F. und Harris, C. C. (1993). Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5123–5127.
- Platt K.L., Molitor, E., Doehmer, J., Dogra, S. und Oesch, F. (1989). Genetically engineered V79 Chinese hamster cells express monooxygenase activity of purified cytochrome P450IIB1. *J Biochem Toxicol* 4, 1–6.
- Rogiers, V., Vandenberghe, Y., Callaerts, A., Verleye, G., Cornet, M., Mertens, K., Sonck, W. und Vercruyse A. (1990). Phase I and phase II xenobiotic biotransformation in cultures and co-cultures of adult rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1701–1709.
- Schmalix, W.A., Mäser, H., Kiefer, F., Reen, R., Wiebel, F.J., Gonzalez, F., Seidel, A., Glatt, H.R., Greim, H. und Doehmer, J. (1993). Stable expression of human cytochrome P450 1A1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and metabolic activation of benzo[a]pyrene. *Eur. J. Pharmacol., Sect. Environm. Toxicol. Pharmacol.* 248, 251–261.
- Waxman D.J., Lapenson D.P., Morrissey J.J., Park S.S., Gelboin H.V., Doehmer J. und Oesch F. (1989). Androgen hydroxylation catalyzed by a cell line (SD1) that stably expresses rat hepatic P-450 PB-4 (IIB1). *Biochemical Journal* 260, 81–85.
- Wölfel C., Platt K.L., Dogra S., Glatt Hr., Wächter F. und Doehmer J. (1991). Stable expression of rat cytochrome P450IA2 cDNA in V79 Chinese hamster cells and hydroxylation of 17 β -estradiol and 2-aminofluorene. *Molecular Carcinogenesis* 4, 489–498.
- Wölfel C., Heinrich-Hirsch B., Seidel A., Frank H., Ramp U., Wächter F., Wiebel F., Gonzalez F. und Doehmer J. (1992). Genetically engineered V79 Chinese Hamster cells for stable expression of human cytochrome P450IA2 cDNA. *Eur. J. Pharmacol., Sect. Environm. Toxicol. Pharmacol.* 228, 95–102.

Korrespondenzadresse:

Johannes Doehmer
 Institut für Toxikologie und
 Umwelthygiene
 der Technischen Universität
 München
 Lazarettstr. 62
 D-80636 München