



Die gentechnologische Konstruktion von V79 Chinesische Hamsterzellen zur stabilen Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen

J. Doehmer, M. Barrenscheen, S. Dogra, M. Edigkauer, Hr. Giatt, F Oesch, K.L. Platt,
A. Seidel und C. Wölfel
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
Obere Zahlbacher Str. 63, D-6500 Mainz

Zusammenfassung

Durch gentechnologische Verfahren werden V79 Chinesische Hamsterzellen mit besonderen Eigenschaften des Fremdstoff-Metabolismus ausgestattet. Das Besondere an diesen neuartigen Zellen als Prüfsystem in der Toxikologie und Pharmakologie ist die Möglichkeit, an einer etablierten Zelllinie die Entstehung von Metaboliten aus Fremdstoffen und zugleich deren mutagene und zytotoxische Wirkung unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen untersuchen zu können.

Summary: Genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of xenobiotics metabolizing enzymes

V79 derived Chinese hamster cells lines with specific xenobiotica metabolizing functions were constructed by gene technological means. The significance of these cell lines as a test system in toxicology and pharmacology has been demonstrated by the evaluation of metabolite profiles of pharmaceuticals and xenobiotica, and the mutagenic and cytotoxic potency of the metabolites under defined and reproducible conditions.

Problemstellung

Es ist von fundamentalem toxikologischem und pharmakologischem Interesse zu verstehen, unter welchen Bedingungen Fremdstoffe aus der Umwelt und insbesondere Medikamente verstoffwechselt werden (Bio-transformation), welche Metabolite dabei entstehen und welche toxikologischen und pharmakologischen Wirkungen diese Intermediär-Produkte haben (biologischer Endpunkt). Beide Aspekte müssen in einem aussagekräftigen Untersuchungssystem vereint sein. Gegenwärtig ist diese Bedingung nur im intakten Organismus gegeben. Die Situation im intakten Organismus ist aber durch eine außerordentliche Komplexität belastet, die es nahezu unmöglich macht, die Bedingungen der metabolischen Aktivierung aufzuklären. Ebenso ist es mitunter schwierig, einen praktikablen

und einfachen biologischen Endpunkt im Tier zu definieren. Als ein Ausweg aus der Komplexität und als eine Vereinfachung wurde bereits in den 60er Jahren daran gearbeitet, kultivierte Zellen als alternatives System einzusetzen (siehe auch Bieri et al. (1)). Allerdings stellte sich heraus, daß kultivierte Zellen sehr rasch Eigenschaften des Fremdstoff-Metabolismus verlieren, die sie im Organverbund noch besaßen. Auch hier zeigte sich, daß Zellen während der Kultivierung und Etablierung als Zelllinie einen Entdifferenzierungs-Prozeß durchlaufen und organspezifische Leistungen verlieren. Insbesondere die Schlüssel-Enzyme des Fremdstoff-Metabolismus, die Cytochrome P450, durch welche besonders häufig die entscheidende metabolische Aktivierung geschieht, werden erheblich reduziert oder überhaupt nicht mehr gebildet.

Cytochrome P450 sind eine Familie von Hämproteinen, die alle nach dem gleichen Prinzip ein Atom Sauerstoff auf ihr Substrat übertragen können. Der Name P450 war zunächst technischer Art und hatte vorläufigen Charakter und ergab sich aus der typischen Absorption bei der Wellenlänge 450 nm im Differenzspektrum des CO-Komplexes ihres reduzierten Eisen-Häm-Anteils. Der Name hat sich eingebürgert und wird bis heute beibehalten. Die Familie der Cytochrome P450 ist in einzelne Gruppen eingeteilt. Diese unterscheiden sich in erster Linie hinsichtlich ihrer Substrat-Spezifität, die aber in den meisten Fällen nicht 100%ig gegeben ist. Häufig wird eine Überlappung der Substrat-Spezifitäten zwischen verschiedenen Cytochromen P450 beobachtet. Es gibt eine Reihe von Formen, die große pharmakologische oder toxikologische Bedeutung besitzen. So ist das Cytochrom P450IA2 hauptsächlich verantwortlich für die metabolische Aktivierung von aromatischen Amininen, beispielsweise 2-Aminofluoren. Das Cytochrom P450IA1, eng verwandt bis in die Gensequenz mit dem P450IA2, metabolisiert bevorzugt polyzyklische Kohlenwasserstoffe, beispielsweise Benzo[*a*]pyren. Das mutagene Potential dieser Substanzen läßt sich aber nur in Systemen feststellen, die die entsprechende Cytochrom P450 Form exprimieren.

Es war dann ursprünglich die Idee von Malling (2), den in Zellen fehlenden Fremdstoff-Metabolismus durch Hinzufügen von frischem Leber-Homogenat oder Fraktionen davon ("Mikrosomen") zu ersetzen. Darauf



basiert das von Ames et al. (3) entwickelte Salmonellen-System, die Mutagenität von reaktiven Metaboliten durch Reversion von Histidin-Mangel-Mutanten zu messen. Entsprechend wurde auch bei der Verwendung von Säugerzellen verfahren. Langenbach et al. (4) führte beispielsweise die Ko-Kultivierung von Zellen des Chinesischen Hamsters (V79) als Indikator-Zelle und primäre Leberzellen als metabolisierende Komponente ein.

All diesen Systemen ist gemeinsam, daß Metabolite aus Fremdstoffen und Pharmaka außerhalb der Indikatorzelle entstehen. Die Wirkung dieser Metabolite lassen sich aber nur dann erkennen, wenn sie in die Indikatorzelle eindringen können. Darin ist die Gefahr der "falsch negativen Ergebnisse" zu sehen. Bevor reaktive Metabolite das Innere einer Indikatorzelle erreichen, können sie mit hochmolekularen Strukturen wie DNA, RNA und Protein im Leberhomogenat ("S9 mix") reagieren oder zu nicht reaktiven Endprodukten prozessiert werden. Frisch präparierte Hepatozyten als Indikatorzellen wären von ihrer Enzymausstattung zwar geeignet, diese Probleme zu vermeiden, allerdings ist die wiederholte Präparation aufwendig. Hinzu kommt, daß die metabolische Leistung primärer Hepatozyten von Präparation zu Präparation verschieden sein kann, was die Reproduzierbarkeit von Messungen stark einschränkt. Schließlich lassen sich eigentliche Mutationen, also Veränderungen des Erbgutes in den Tochterzellen, nicht untersuchen, da metabolisch kompetente Hepatozyten nicht proliferieren. Die Kultivierung von primären Hepatozyten ist aufwendig. Es bedarf darüberhinaus noch eines speziellen Kulturmediums, um die Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme über mehr als eine Woche aufrechtzuerhalten (1). Gewünscht ist eine Kultur von teilungsfähigen Zellen, die Pharmaka und andere Fremdstoffe meßbar und konstant metabolisieren können.

Aus dem Umgang mit Genen zum Zwecke des Gentransfers in kultivierte Zellen haben wir in den vergangenen Jahren gelernt, daß das übertragene Gen ohne Schwierigkeit von der Empfängerzelle gelesen wird, obwohl das eigene orthologe Gen der Empfängerzelle abgeschaltet oder natürlicherweise nie in dieser Zelle abgelesen wurde. Nichtsdestoweniger kann dann eine Zelle nach erfolgreichem Gentransfer ein authentisches Produkt



herstellen (5). In Kenntnis dieser Möglichkeiten wurde 1987 begonnen, Zellen, die aufgrund ihres Wachstumsverhaltens für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen geeignet sind, auf gentechnologischem Wege so zu verändern, daß sie in der Lage sind, Fremdstoffe selbständig zu metabolisieren.

Experimentelle Strategie und Methodik

1. Klonierung des interessierenden Gens (insbesondere von Cytochromen P450) in Form einer vollständigen cDNA aus Genbanken
2. Rekombination mit einem eukaryotischen Vektor, der die cDNA mit Ablese-Signalen versorgt (bevorzugt SV40 *early promotor*)
3. Übertragung des rekombinanten Vektors in eine geeignete Empfängerzelle (bevorzugt V79 Chinesische Hamsterzellen) durch DNA gekoppelten Gentransfer (bevorzugt Ca/P-Koprazipitation)
4. Selektion und Identifizierung der nach Gentransfer wachsenden Zellklone auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene zum Nachweis des gewünschten Genproduktes
5. Enzymatische Charakterisierung des Genproduktes
6. Evaluierung der Zellklone mit Substanzen, von denen bekannt oder zumindest zu erwarten ist, daß sie metabolisch aktiviert werden
7. Anwendung der neuen Zelllinien zur Lösung toxikologischer und pharmakologischer Probleme

Stand der Entwicklung

In einem Zeitraum von vier Jahren gelang uns die Konstruktion von verschiedenen V79-abgeleiteten Zelllinien. Alle Zelllinien konnten bereits in Zytotoxizitäts-, Mutagenitäts- und Metabolismus-Untersuchungen validiert werden. Somit stehen diese Zelllinien als neuartiges analytisches Werkzeug zur Verfügung. Durch eine Zusammenarbeit mit Dr. Frank Gonzalez am NIH, Bethesda, (U.S.A.) und durch die Nutzung neuer Labors im Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung der Johannes



Gutenberg-Universität, sowie durch Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesgesundheitsamtes konnten wir die Entwicklung neuer Zelllinien mit definierten Leistungen des Fremdstoff-Metabolismus erheblich beschleunigen.

- Allen V79-abgeleiteten Zelllinien ist gemeinsam, da sie für die durch Gentransfer erworbene Eigenschaft, ein bestimmtes Cytochrom P450 zu exprimieren, definiert sind, da die parentale Zelllinie V79 kein Cytochrom P450 exprimiert.
- Die Zelllinie SD1 (6) exprimiert das Cytochrom P450IIB1. Es ist die Hauptform der Phenobarbital-induzierbaren Cytochrome P450.
- Die Zelllinie XEM2 (7) exprimiert das Cytochrom P450IA1. Dieses Cytochrom metabolisiert sehr effektiv polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.
- Die Zelllinien XEMd-Mz (8) und XEMd-NH (9) exprimieren das Cytochrom P450IA2 der Ratte mit und ohne Acetyltransferase. Eine typische Aktivität dieses Cytochroms ist die N-Oxidation von aromatischen Aminen. Die Zelllinien wurden validiert durch spezifische Hydroxylierung von 17 β -Östradiol und 2-Aminofluoren.
- Die Zelllinien XEMh-Mz and XEMh-NH (10) exprimieren das menschliche Cytochrom P450IA2 mit und ohne Acetyltransferase.

Die Zelllinien wurden bereits durch folgende Untersuchungen im Detail evaluiert: (Abb. 1-4, Tabelle 1):

- 1) Regio- und stereoselektive metabolische Modifizierung von Steroiden wie Testosteron (11) und Androstendion (12)
- 2) Metabolische Aktivierung des in der Krebstherapie verwandten Zytostatikums Cyclophosphamid (13)
- 3) Mutagene Wirkung von Aflatoxin B1 (6; 14), metabolisiertem Benzo[a]pyren und dessen Metaboliten trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyren (7; 14)
- 4) Erstellung eines Metabolitenprofils des polyzyklischen Kohlenwasserstoffes Picen und Identifizierung der metabolisch kompetenten P450 Form durch vergleichenden Einsatz von mehreren Zelllinien

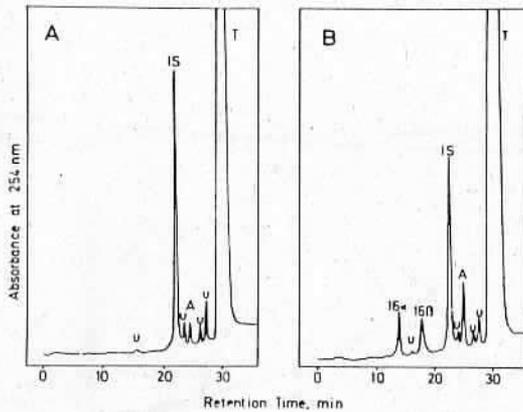


Abbildung 1:

HPLC-Chromatogramm nach Metabolisierung von Testosteron in einer mikrosomalen Präparation von V79-Zellen (A) und den davon abgeleiteten Cytochrom P450IIB1 exprimierenden SD1-Zellen (B).

T=Testosteron, IS=Corticosteron als interner Standard, U=nicht identifiziert, A=Androstendion, 16 α und 16 β = Testosteron hydroxyliert in der 16 α - und 16 β -Position. Mit diesem Chromatogramm wurde gezeigt, daß die SD1-Zellen Testosteron metabolisieren wie für das gereinigte Cytochrom P450IIB1 beschrieben.

- 5) Metabolische Untersuchungen eines Serotonin-Antagonisten "ICS" und anderer (Fischer und Maurer, Sandoz AG, Basel)
- 6) Etablierung des Mikrokern-Assays mit diesen Zelllinien durch James Parry und Sian Ellard (University Swansea, United Kingdom) (15)
- 7) Untersuchungen zur Biotransformation von Koffein und Theophyllin durch Uwe Fuhr und A. Horst Staib (Universitätsklinik Frankfurt) (16)

Zukünftige Entwicklungen

Ziel ist die Einrichtung einer Batterie von V79-abgeleiteten Zelllinien, die für metabolische Leistungen des Stoffwechsels von Pharmaka und anderen Fremdstoffen hoch definiert sind. Die Schaffung solcher Zelllinien wird in erheblichem Maße dazu beitragen, den Mechanismus der Metabolisierung und die toxikologischen und pharmakologischen Wirkungen der entstehenden Metabolite auf molekularer und zellulärer Ebene zu verstehen.

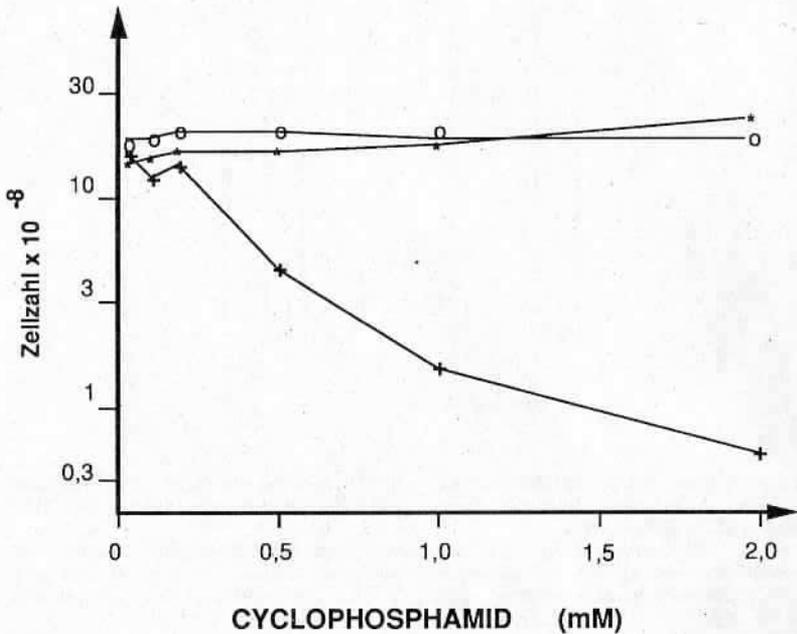


Abbildung 2:

Überlebensraten von V79- (o), XEM2- (x) und SD1-Zellen (+) nach 24-stündiger Inkubation mit Cyclophosphamid in verschiedenen Konzentrationen. Cyclophosphamid ist ein Zytostatikum, bei dem erst durch ein Cytochrom P450 der zytostatisch wirksame Metabolite generiert wird. Mit der hier dargestellten Untersuchung läßt sich die metabolisch kompetente P450 Enzymform identifizieren und eine Dosis/Wirkungs-Beziehung auf zellulärer Ebene ermitteln. Keine Wirkung des Cyclophosphamids in V79 Zellen, die kein Cytochrom P450 produzieren. Ebenfalls keine Wirkung in XEM2-Zellen, die das Cytochrom P450IA1 enthalten. Eine deutliche zytostatische Wirkung in SD1-Zellen, die die metabolisch kompetente Cytochrom P450IIB1 Enzymform exprimieren.

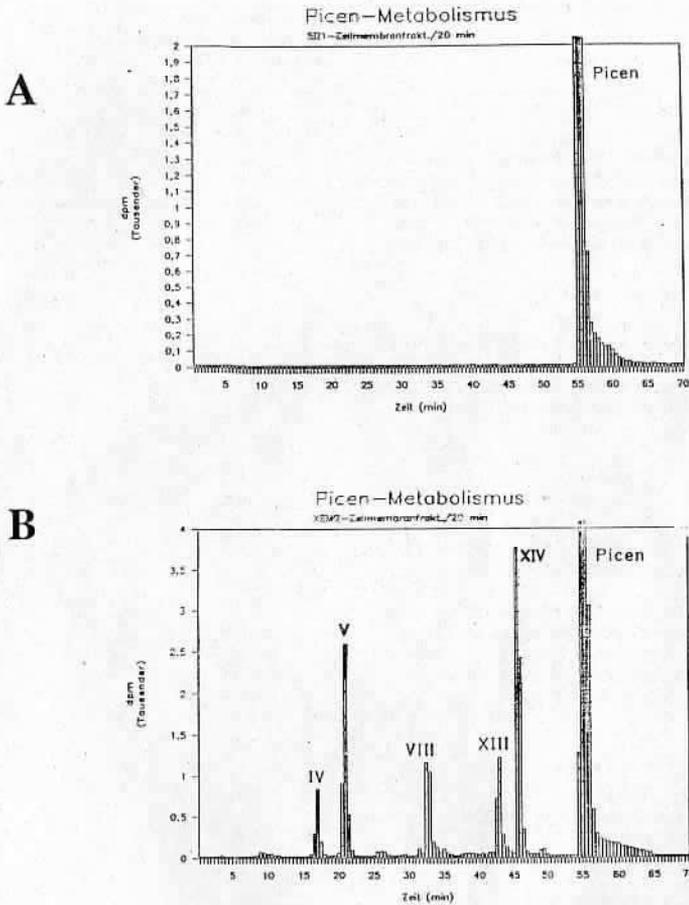


Abbildung 3:

Metaboliten-Profil des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Picen. Keine Metabolisierung in den Cytochrom P450IIB1 exprimierenden SD1-Zellen (A), hingegen Metabolisierung in den Cytochrom P450IA1 exprimierenden XEM2-Zellen (B).



Zelllinie	Mutagen	Häufigkeit von 6-Thioguanin-resistenten Zellen x 10 ⁶
V79	kein	9
	kein	5
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.03 µM)	5
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.10 µM)	9
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (1.00 µM)	9
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (3.00 µM)	15
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (10.00 µM)	45
SD1	kein	3
	(P450IIB1) kein	6
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.03 µM)	3
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.10 µM)	6
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (3.00 µM)	14
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (10.00 µM)	32
XEM1	kein	1
	(P450IA1) kein	3
	Benzo[a]pyren (1.00 µM)	8
	Benzo[a]pyren (3.00 µM)	12
	Benzo[a]pyren (10.00 µM)	17
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.03 µM)	85
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.10 µM)	360
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (1.00 µM)	1208
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (10.00 µM)	1401
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (30.00 µM)	1798
XEM2	kein	4
	(P450IA1) kein	9
	Benzo[a]pyren (1.00 µM)	91
	Benzo[a]pyren (3.00 µM)	185
	Benzo[a]pyren (10.00 µM)	257
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.03 µM)	225
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (0.10 µM)	617
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (1.00 µM)	1154
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (10.00 µM)	toxisch ^a
	<i>trans</i> -B[a]P-7,8-diol (30.00 µM)	toxisch ^a

Tabelle 1:

Mutagenität von Benzo[a]pyren und *trans*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyren (*trans*-B[a]P-7,8-diol) in V79-, SD1-, XEM1- und XEM2- Zellen; kein = Negativkontrolle; ^a = wegen erhöhter Zytotoxizität nicht mehr auswertbar. Die Zellen wurden für 24 Stunden den Testsubstanzen ausgesetzt. Das mutagene Potential der Substanzen wird durch ihre Fähigkeit geprüft, das Gen HPRT zu mutieren. Nur die Zellen überleben ein 6-Thioguanin haltiges Medium, deren HPRT-Gen durch Mutation ausfällt. Solche Zellen werden nach etwa 10 Tagen als Klone sichtbar. Die Anzahl der 6-Thioguanin resistenten Zellklone entspricht der mutagenen Wirkung der Testsubstanzen bei gegebener Konzentration. Eine deutliche mutagene Wirkung ist nur an den Cytochrom P450IA1 exprimierenden Zellen XEM1 und XEM2 zu beobachten, wobei die Wirkung bei XEM2-Zellen stärker ausfällt, da der P450IA1 Gehalt in diesen Zellen 5fach höher ist als in XEM1.

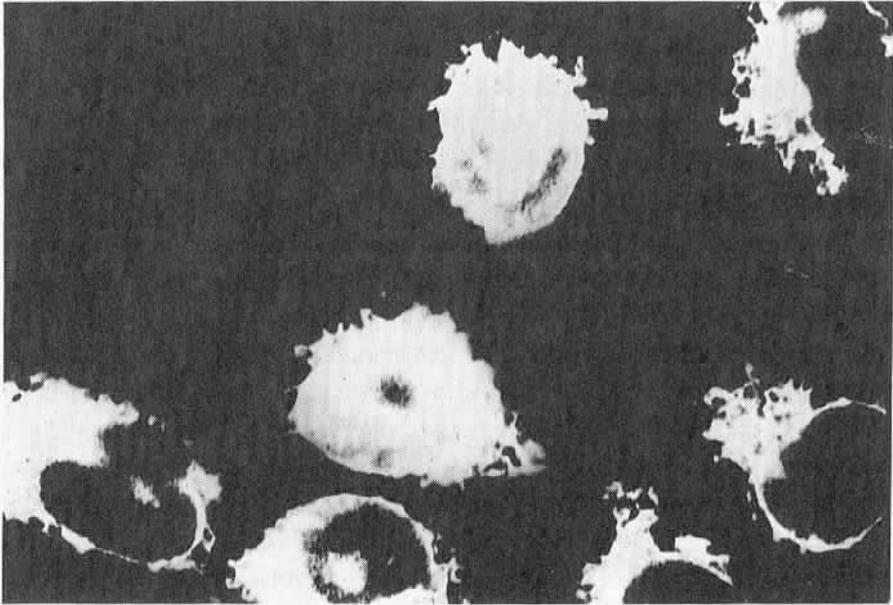


Abbildung 4:

Fluoreszenz-Aufnahme von P450IIB1 exprimierenden SD1-Zellen nach Inkubation mit einem gegen P450IIB1 gerichteten Antikörper. Es fluoreszieren Kernmembran und das Endoplasmatische Retikulum. Keine Fluoreszenz im Zellkern, ebenso keine Fluoreszenz auf der Zellmembran und keine diffuse Fluoreszenz im Cytoplasma. Die beiden Zellen, die eine nahezu durchgehende Fluoreszenz zeigen, sind mitotische Zellen, die noch nicht ausgebreitet sind. Diese Aufnahme macht deutlich, daß das gentechnologisch hergestellte Cytochrom P450 wie das native P450 in einer Zelle, beispielsweise einer Leberzelle, verteilt ist. Die Zelllinien sind daher nicht nur enzymatisch sondern auch biologisch hinsichtlich der zellulären Kompartimentalisierung des Cytochroms P450 signifikant.

Alle bisher von uns entwickelten Zelllinien exprimierten anfänglich Cytochrome P450 der Ratte. Ausschlaggebend für unseren Ansatz war das Akzeptanz-Problem unserer neuartigen Zelllinien. Die meisten enzymatischen Daten, die uns zum Vergleich zur Verfügung stehen, wurden an gereinigten P450-Formen der Ratte gewonnen. Nachdem an drei verschiedenen P450-Isoformen als Beispiele gezeigt worden war, daß sich die neuartigen Zelllinien wie das gereinigte Cytochrom P450 gegenüber Fremdstoffen verhalten, sollen nunmehr bevorzugt menschliche Cytochrom P450-Formen und ihre Expression in V79-Zellen bewerkstelligt werden, um zukünftig Ergebnisse zu erhalten, die für die menschliche in vivo-



Situation relevanter sein können. Aus diesem Grund wird mit Dr. Frank Gonzalez, NIH, Bethesda, verstärkt zusammengearbeitet, weil uns mit dieser Zusammenarbeit bereits klonierte menschliche P450-cDNAs zur Verfügung stehen. Aus dieser Zusammenarbeit ergaben sich kürzlich die neuen V79-abgeleiteten Zelllinien, die das menschliche Cytochrom P450 IA2 exprimieren.

Wie an den oben erwähnten Beispielen gezeigt, sind die V79-abgeleiteten und gentechnologisch konstruierten Zelllinien ein hervorragendes analytisches Werkzeug, um die komplexe in vivo-Situation zu verstehen. Es wäre aber ein Mißverständnis anzunehmen, daß diese Zellen eine Art immortalierter Leberzellen seien. Die Komplexität des Fremdstoff-Metabolismus in der Leber mit allen daran beteiligten Enzymen, Substraten und Metaboliten ist eine Wirklichkeit, die mit den neuartigen Zellen nicht zu ersetzen ist. Trotzdem werden auch Zellen konstruiert werden, die der Komplexität in gewisser Weise Rechnung tragen sollen, indem außer einem bestimmten Cytochrom P450 auch das damit zusammenwirkende Folgeenzym mit exprimiert wird, wie wir das nun erstmals für P450IA2 und Acetyltransferase gezeigt haben. Es ist absehbar, daß die neuartigen Zelllinien ein ergänzendes und rationales Werkzeug in toxikologischen und pharmakologischen Untersuchungen sein werden, wenn es um konkrete Probleme geht, wie etwa den Beitrag von bestimmten Enzymen an der Umsetzung von Fremdstoffen zu ermitteln, Einflüsse der Ko-Medikation auf die Aktivität bestimmter P450-Isoformen festzustellen, die metabolisch kompetenten P450-Isoform zu identifizieren. Bei diesen Fragestellungen können die neuartigen Zelllinien dazu beitragen, Tierversuche zu reduzieren oder sogar letztlich zu ersetzen.

Außer den hier vorgestellten V79 Chinesischen Hamsterzellen werden auch andere kultivierte Säugerzellen auf gentechnologischem Wege zur Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme gebracht. Beispielhaft zu nennen wären Robert Langenbach und Kollegen mit Arbeiten an 10T1/2 Mausezellen (17), Charles Crespi und Frank Gonzales und Kollegen an menschlichen AHH1 Zellen (18), Jim Felton und Larry Thomson und Kollegen an Chinese hamster ovary (CHO) Zellen (19) und Nara Battula an Mausfibroblasten (NIH 3T3) (20). Diese Zellen haben andere Eigenschaften als die V79 Hamsterzellen und können deshalb in gewissen Fällen für die Anwendung geeigneter erscheinen.



Danksagung

Die Arbeiten werden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft als Teilprojekt B60 im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 302 ("Kontrollfaktoren der Tumorentstehung") und durch das Bundesgesundheitsamt, ZEBET ("Die gentechnologische Konstruktion von V79 Hamsterzellen zur stabilen Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen des Menschen und ihre Anwendung in Metabolismus- und Mutagenitätsstudien von Fremdstoffen und Pharmaka"). An dieser Stelle sei auch für eine Spende der Jupp und Margot Abels-Stiftung, Frankfurt/M. gedankt. Last but not least sei dem Naturwissenschaftlich-Medizinischen Forschungszentrum der Johannes Gutenberg-Universität (NMFZ) für langjährige Förderung gedankt.

Literatur

1. Bieri, F., Muakkassah-Kelly, S., Bentley, P.: Die Anwendung von Hepatozytenkulturen zur Erkennung leberkrebserzeugender Substanzen. Möglichkeiten und Grenzen. in: ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) Nr. 12, 24 (1990).
2. Malling, H.V.: Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. *Mutat. Res.* 13, 425-429 (1971).
3. Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsomal mutagenicity test. *Mutat. Res.* 71, 43-652 (1975).
4. Langenbach, R., Freed, H.J., Huberman, E.: Liver cell-mediated mutagenesis of mammalian cells by liver carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2864-2867 (1978).
5. Doehmer, J., Barinaga, M., Vale, W., Rosenfeld, M.G., Verma, I.M., Evans, R.M.: Introduction of rat growth hormone gene into mouse fibroblasts via a retroviral DNA vector: Expression and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2268-2272 (1982).
6. Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, Hr., Oesch, F.: Stable expression of cytochrome P-450IIB1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5769-5773 (1988).
7. Dogra, S., Doehmer, J., Glatt, Hr., Siegert, P., Friedberg, T., Seidel, A., Oesch, F.: Stable expression of rat cytochrome P-450IA1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their use in mutagenicity testing. *Molecular Pharmacology*, 37, 608-613 (1990).
8. Wölfel, C., Platt, K.L., Dogra, S., Glatt, Hr., Wächter, F., Oesch, F., Doehmer, J.: Stable expression of rat cytochrome P450IA2 cDNA in V79 Chinese hamster cells and hydroxylation 17 β -estradiol and 2-aminofluorene. *Molecular Carcinogenesis*, in press (1991).



9. Glatt, Hr., Wölfel, C., Pauly, K., Wiebel, E.I., Doehmer, J.: Expression endogenous acetyltransferase and rat P450IA2 in V79 cells: Mutagenicity of aromatic amines. Manuscript in preparation (1991).
10. Wölfel, C., Wiebel, J., Glatt, Hr., Doehmer, J.: Stable expression of human cytochrom P450IA2 and acetyltransferase in V79 Chinese hamster cells. Manuscript in preparation (1991/1992).
11. Platt, K., Molitor, E., Doehmer, J., Dogra, S., Oesch, F.: Characterization of the translation product of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA expressed in Chinese hamster (V79) cells by its testosterone metabolism. *J. Biochem. Toxicol.* 4, 1-6 (1989).
12. Waxman, D.J., Lapenson, D.P., Morrissey, J.J., Park, S.S., Gelboin, H.V., Doehmer, J., Oesch, F.: Androgen hydroxylation catalyzed by a cell line (SD1) that stably expresses rat hepatic P-450 PB-4 (IIB1). *Biochem. J.* 260, 81-85 (1989).
13. Doehmer, J., Seidel, A., Oesch, F., Glatt, Hr.: Genetically engineered V79 Chinese hamster cells metabolically activate the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide. *Environmental Health Perspectives* 88, 63-65 (1990).
14. Glatt, Hr., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., Oesch, F.: Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* 1, 313-333 (1989).
15. Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wölfel, C., Doehmer, J., Parry, J.: The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver cytochromes IA1, IA2, IIB1 cDNAs in micronucleus assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, in press (1991).
16. Fuhr, U., Doehmer, J., Battula, N., Wölfel, C., Flick, I., Kudla, C., Keita, Y., Staib, A.H.: Biotransformation of caffeine and theophylline in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isoforms. Manuscript in preparation (1991).
17. Hansen, S.K., Ross, J.A., Siegfried, J.M., Leavitt, S., Rudo, K., Langenbach, R., Nesnow, S.: Transfection of a rat cytochrome P450b cDNA into C3H10T1/2Cl8 mouse embryo fibroblasts. *Molecular Carcinogenesis* 2, 261-267 (1989).
18. Crespi, C.L., Steimel, D.T., Aoyama, T., Gelboin, H.V., Gonzalez, E.J.: Stable expression of human cytochrome CYP1A2 cDNA in a human lymphoblastoid cell line: Role of the enzyme in the metabolic activation of aflatoxin B1. *Molecular Carcinogenesis* 3, 5-8 (1990).
19. Thompson, L.H., Wu, R.W., Felton, J.S.: Introduction of cytochrome P450IA2 metabolic capability into cell lines genetically matched for DNA repair proficiency/deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press, 1991.
20. Battula, N.: Transduction of cytochrome P3-450 by retroviruses: Constitutive expression of enzymatically active microsomal hemoprotein in animal cells. *J. Biol. Chem.* 264, 2991-2996 (1989).