

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

***Tumorpromotion durch nicht-dioxinartige polychlorierte Biphenyle
(PCB)***

von

Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie
Universität Kaiserslautern

Förderkennzeichen: PUGU 97008

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden
mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Dezember 2001

1. Motivation und Rationale für das Vorhaben

Die polychlorierten Biphenyle (PCBs) stellen eine der wichtigsten Gruppen von persistenten organischen Umweltkontaminanten dar. Sie reichern sich im menschlichen Körper an und werden z.B. mit der Muttermilch an gestillte Säuglinge weitergegeben. Darüber hinaus sind sie in vielen höheren Tieren zu finden und werden dort für Störungen des Immunsystems und der Fortpflanzung verantwortlich gemacht.

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der toxikologischen Bewertung von PCBs ist deren krebserregende (tumorpromovierende) Eigenschaft. Bei der Bewertung einzelner aus den 209 möglichen PCB-Substitutionsisomeren (Kongeneren) werden die ‚dioxinartigen‘ mit Äquivalenzfaktoren (Toxicity Equivalency Factors; TEFs) belegt. Durch Multiplikation des jeweiligen Äquivalenzfaktors mit dem Gehalt einer Probe (Lebensmittel, Raumluft, Boden etc.) und Aufsummierung der so erhaltenen Werte ergibt sich ein Summenparameter (Toxizitätsäquivalente; Toxicity Equivalents; TEq), der sich bei der Risikobewertung dieser Untergruppe bewährt hat.

Ein vergleichbares Verfahren für die ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs ist derzeit nicht in Sicht. Dies beruht vor allem auf einem unzureichenden Verständnis der spezies- und zellspezifischen Wirkmechanismen dieser Untergruppe auf Molekularebene.

Im abgeschlossenen Vorhaben sollte ein zentraler Mechanismus der tumorpromovierenden Wirkung von Fremdstoffen, die Hemmung der Apoptose (programmierter Zelltod), untersucht werden. Für eine Reihe von Tumorpromotoren wurde nämlich gezeigt, dass sie die Apoptose von Krebsvorstufen (Präneoplasien) in der Leber von Nagern effektiv unterdrücken können. Die Konsequenz dieser Wirkung ist eine indirekte Förderung des klonalen Wachstums derartiger Vorstufen, welche mit einem erhöhten Risiko der Ausbildung maligner Tumorzellen einhergeht. In einem *in-vitro* Modell sollte die Wirkung von tumorpromovierenden, ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs auf die Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Grundlage eines Tierexperiments gemacht werden. Es wurden wegweisende Ergebnisse zur Risikobewertung von ‚nicht-

dioxinartigen PCBs erwartet, die als Grundlage für ein Äquivalenzkonzept für diese Stoffklasse, wenigstens bezüglich der Tumorpromotion in der Leber, dienen könnten.

2. Aufgabenstellung

Es sollten eine Reihe von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs auf ihre apoptosehemmende Wirkung in einem *in-vitro* Modell (Rattenhepatozyten in Primärkultur) untersucht werden. Ferner sollten diese Ergebnisse mit bekannten biochemischen Konsequenzen einer Behandlung von Zellen mit diesen PCBs verglichen werden. Schließlich sollten die Ergebnisse zur Grundlage für eine tierexperimentelle Studie zur tumorpromovierenden Wirkung der fraglichen Verbindungen in der Rattenleber gemacht werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Auf der Basis bisheriger Untersuchungen mit dem Tumorpromotor 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) konnten die fraglichen PCBs auf ihre Fähigkeit zur Apoptosehemmung in Rattenhepatozyten überprüft werden. Die Untersuchungen waren wegen der großen Zahl von Einzelkonzentrationen und der für eine statistische Auswertung notwendigen Probenzahl außerordentlich zeitraubend und konnten im Sommer 2000 abgeschlossen werden. Das vorgesehene Tierexperiment wurde in Zusammenarbeit mit Prof. M. Schwarz (Institut für Toxikologie, Universität Tübingen) detailliert geplant. Leider ergab sich für die aufgrund der Zellkulturuntersuchungen geeignetsten Verbindungen ein Bedarf, der sich aus Mitteln des Projektes nicht finanzieren ließ. Daher wurde Prof. L. Robertson (University of Kentucky, Lexington, USA) und seine Arbeitsgruppe für die Synthese dieser Verbindungen gewonnen. Da bei der Synthese einer Verbindung ein neues Verfahren angewandt werden mußte, stehen die Substanzen erst jetzt für das Tierexperiment zur Verfügung. Damit kommt es bezüglich des tierexperimentellen Teils des Projektes zu einer Überschreitung der geplanten Laufzeit.

4. wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Aus Vorarbeiten im eigenen Labor und in anderen Arbeitsgruppen war bekannt, dass eine Reihe von Tumorpromotoren der Hepatokarzinogenese der Ratte die Apoptose in unterschiedlichen Zellkulturmodellen hemmen können. Insbesondere konnten Bayly et al. (1994) eine Hemmung der Apoptose durch den Peroxisomenproliferator Nafenopin und durch Phenobarbital zeigen. In eigenen Arbeiten konnte belegt werden, dass sowohl TCDD als auch Phenobarbital die durch UV-Bestrahlung hervorgerufene Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur unterdrücken können (Wörner und Schrenk, 1996).

Aus *in-vivo* Untersuchungen an Nagern war hinlänglich bekannt, dass die Hemmung der Apoptose präneoplastischer Hepatozyten eine wesentliche, wenn nicht entscheidende Rolle bei der tumorpromovierenden Wirkung vieler Verbindungen spielt (Bursch et al, 1984; Schulte-Hermann et al., 1990; Stinchcombe et al., 1995). Allerdings sind weder nicht Mechanismen der basal erhöhten Apoptoserate in Präneoplasien noch die der Apoptosehemmung durch Promotoren aufgeklärt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Bei der Planung des tierexperimentellen Teils bestand eine enge Zusammenarbeit mit Prof. M. Schwarz (Institut für Toxikologie, Universität Tübingen). Die Durchführung des Tierexperimentes soll an der Universität Kaiserslautern, die histologische Auswertung in Tübingen erfolgen. Ferner besteht eine Kooperation mit Prof. L. Robertson, (University of Kentucky, Lexington, USA), der die Synthese der PCBs Nr. 28 und 187 übernommen hat

6. Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms des Zuwendungsgebers

Persistente organische Umweltschadstoffe zählen zu den wichtigsten Bedrohungen für Umwelt und Gesundheit und stellen eine zentrale Herausforderung an die moderne Toxikologie dar. Die polychlorierten Biphenyle als namhafte Vertreter dieser Gruppe werden für viele Gesundheitsstörungen z.B. in Innenräumen verantwortlich gemacht.

Bei dieser Diskussion spielt immer wieder die krebserregende Wirkung eine herausragende Rolle. Insbesondere für die ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs liegt bislang keine hinreichende Risikobewertung vor. Dies beruht vor allem auf dem fehlenden Verständnis der molekularen Wirkprinzipien. Im Gegensatz dazu konnten die ‚dioxinartigen‘ PCBs in das TEq-Konzept der dioxinartigen Umweltschadstoffe eingereiht werden. Dies ermöglicht, wenigstens teilweise, eine rationale Risikobewertung.

7. erzielte Ergebnisse

7.1. Zusammenfassung

Die polychlorierten Biphenyle (PCB) zählen zu den besonders persistenten Umweltkontaminanten und werden weltweit zu den 12 wichtigsten Klassen der ‚persistent organic pollutants‘ (POPs) gerechnet. In Versuchstieren entfalten sie u.a. neurotoxische, teratogene und tumorpromovierende (krebserregende) Wirkungen. Eine Reihe von PCB wurden wegen ihres biochemischen und toxischen Wirkspektrums als ‚dioxinartig‘ eingestuft während andere als ‚nicht-dioxinartig‘ klassifiziert werden. Viele der letztgenannten PCB-Kongenere wirken in der Rattenleber als Induktoren der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Cytochrom P450 (CYP) 2B1 und 2B2 und ähneln darin dem Arzneimittel Phenobarbital, ebenfalls ein Tumorpromotor. Im Gegensatz dazu induzieren ‚dioxinartige‘ PCB CYP1A-Isoenzyme, andere Kongenere wurden als ‚Mischtyp-Induktoren‘ bezeichnet, d.h., sie induzieren sowohl CYP2B1/2B2 als auch CYP1A-Isoenzyme.

Die Hemmung der Apoptose präneoplastischer Hepatozyten gilt als ein zentraler Mechanismus der Tumorpromotion in der Rattenleber. Um diese Wirkung in einem in vitro-Modell untersuchen und damit besser verstehen zu können, haben wir Rattenhepatozyten in Primärkultur einer apoptogenen UV-Dosis ausgesetzt und anschließend mit PCB behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass Phenobarbital und die ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB Nr. 28, 1001 und 187 die durch UV-Bestrahlung ausgelöste Apoptose vollständig unterdrücken können. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und EC₅₀-Werte für diese Wirkung waren verschieden von denjenigen für die Induktion der durch CYP2B1/2B2 katalysierten 7-Pentoxoresorufin-O-dealkylase (PROD)- und der durch CYP1A katalysierten 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivitäten.

Sowohl Phenobarbital als auch die untersuchten PCB hatten keinen Einfluss auf das spontane Auftreten apoptotischer Zellkerne in den Kulturen.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die untersuchten ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB, wenigstens zum Teil, durch Apoptosehemmung tumorpromovierend in der Rattenleber wirken. Die zellulären Signalwege, die zur Induktion von CYP2B1/2B2 führen, sind vermutlich von denen der Apoptosehemmung abgrenzbar, bzw. divergieren voneinander.

7.2. Einleitung

Die polychlorierten Biphenyle (PCB) zählen zu den besonders persistenten Umweltschadstoffen. Als wichtigste Quellen kommen der ehemalige, vielfältige Einsatz technischer PCB-Gemische als Hydrauliköle, Flammschutz- und Schmiermittel, Dichtungsmassen etc. in Frage (1). Darüber hinaus können PCB bei der Verbrennung bzw. Verschwelung von organischem Material in Gegenwart von chlorhaltigen Stoffen gebildet werden (2). Akutvergiftungen mit PCB auf Grund des Verzehrs von mit PCB verunreinigten Reisölen äußerten sich in heftigen Knochen- und Gelenkschmerzen, Chlorakne, und Missbildungen bei den Nachkommen PCB-exponierter Mütter (3). Die chronische Exposition gegenüber erhöhten PCB-Gehalten in der Nahrung z.B. in Fischen während der Schwangerschaft wird mit dem Auftreten von Lernschwäche bei den Nachkommen derart exponierter Mütter in Zusammenhang gebracht (4). In Versuchstieren können PCB zu Neurotoxizität, endokrinen Störungen und zur Tumorpromotion, z.B. in der Nagerleber, führen (1,5,6). In einer Studie an PCB-exponierten Arbeitern wurde eine signifikant erhöhte Inzidenz von Lebertumoren beobachtet (7).

Aus systematisch-toxikologischen sowie aus praktischen Gründen werden die PCB in ‚dioxinartige‘ und ‚nicht-dioxinartige‘ Kongenere unterteilt.

7.3. Material und Methoden

Chemikalien

Rinderserumalbumin, Collagenase Typ IV und Phenobarbital waren von Sigma (Taufkirchen), Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) von Seromed (Berlin) und

Waymouth's Medium MD 705/1 sowie fetales Rinderserum von Gibco BRL (Heidelberg). ITS und ITS⁺ waren von Becton Dickinson (Heidelberg). Die PCBs IUPAC-Nummer 28 (2,4,4'-Trichlorbiphenyl), 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorbiphenyl) und 187 (2,2',3,4',5,5',6-Heptachlorbiphenyl) wurden von Promochem (Wesel) bezogen. Alle anderen Chemikalien hatten den höchsten, kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad.

Hepatozytengewinnung und -kultur

Männliche Wistar-Ratten wurden von Charles River (Kisslegg) bezogen und unter Standardbedingungen gehalten. Adulte Tiere mit einem Körpergewicht von 150-180 g wurden narkotisiert und die Hepatozyten wurden gewonnen wie beschrieben (20), unter Verwendung einer Modifikation der ursprünglich von Seglen (21) beschriebenen, sequentiellen Perfusionstechnik. Die Zellen wurden im Kollagen-Sandwich-Verfahren kultiviert (22). Zur Gewinnung des Kollagens wurden kollagenreiche Fasern aus jeweils acht Rattenschwänzen präpariert und das Kollagen in 80 ml 3%iger Essigsäure bei 4°C unter Rühren gelöst. Das Unlösliche wurde durch Zentrifugieren bei 2300 g und 4°C über 90 min abgetrennt. Zum Überstand wurde ein 1/5 des Volumens 30%ige NaCl-Lösung zugegeben und das ausgeflockte Kollagen durch Zentrifugieren bei 2300 g und 4°C über 30 min gewonnen. Das Sediment wurde in 175 ml 5%iger NaCl-Lösung suspendiert und erneut bei 2300 g und 4°C über 30 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 l 0,6%iger Essigsäure gelöst und mit 0,6%iger Essigsäure auf 400 ml aufgefüllt. Nach 48-stündiger Dialyse gegen 1 mM HCl wurde die Lösung lyophilisiert. Vor dem Gebrauch wurden 1,5 mg Kollagen in 1 ml 1 mM HCl gelöst (Stammlösung). Diese wurde mit 9 Teilen 10x DMEM verdünnt, die Kulturschalen mit jeweils 700 µl dieser Verdünnung beschichtet und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Aushärten des Gels wurden die Zellen ausgesät und inkubiert wie beschrieben (17). Eine Stunde vor der Behandlung wurden die Zellen mit 500 µl Kollagenlösung in 10x DMEM überschichtet.

Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen

Die Hepatozyten wurden in einer Dichte von 100 000/cm² auf Kollagen-beschichtete Petrischalen eines Durchmessers von 60 mm ausgesät und inkubiert wie beschrieben (17). Nach drei Stunden wurden die Zellen mit 700 µl Kollagenlösung in 10x DMEM überschichtet. Zwölf Stunden nach dem Aussäen wurden die PCB, in DMSO gelöst,

bzw. Phenobarbital in steriler 0,9%iger wässriger NaCl-Lösung gelöst, zugegeben. Das DMSO-Volumen betrug höchstens 0,5% des gesamten Flüssigkeitsvolumens pro Kulturschale. Kontrollen wurden nur mit DMSO bzw. NaCl-Lösung behandelt. Achtundvierzig Stunden nach Zugabe der Induktoren wurden die Kulturüberstände, abgesaugt, die Kulturen gespült, abgeerntet und homogenisiert. In den Homogenaten wurde die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD)- und 7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD)-Aktivität mit Hilfe des Verfahrens von Burke und Mayer (23) gemessen.

Unterdrückung der Apoptose

Die Hepatozyten wurden mit einer Dichte von 60 000/cm² auf Quadriperm-Schalen (Heraeus, Frankfurt) auf einer Fläche von 20 mm² ausgesät. Nach 12 Stunden wurde das Medium erneuert und nach 15 Stunden die Zellen mit UV-Licht behandelt wie beschrieben (17). Phenobarbital oder PCB wurden 30 min nach der Bestrahlung zugegeben. Zum Auszählen apoptotischer Kerne wurden die Zellen 12 Stunden später fixiert, gewaschen und luftgetrocknet wie beschrieben (20) und mit einer wässrigen Lösung von 8 µM 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und 10 µM Sulphorhodamin 101 gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung der verschlüsselt kodierten Deckgläschen wurde mit Hilfe eines Zeiss (Jena) Axioskop Fluoreszenzmikroskops, ausgerüstet mit einem BP 450-490 Excitationsfilter und einem LP 520 Emissionsfilter, durchgeführt. Die Deckgläschen wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt wobei jeweils dreimal 1000 Kerne ausgewertet wurden. Kondensierte, halbmondförmige und tröpfchenförmige apoptotische Kerne/Fragmente wurden als Apoptosen gewertet.

Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus unabhängigen Einzelexperimenten ermittelt. Für multiple Vergleiche von behandelten Kulturen mit unbehandelten Kontrollen wurde Dunnett's Test für unabhängige Stichproben verwendet.

7.4. Ergebnisse

In Rattenhepatozyten, die zwischen zwei Kollagenschichten inkubiert wurden

(,Sandwich-Kultur‘), führte ein UV-Bestrahlungspuls mit einer spezifischen Intensität von 90 J/m^2 nach 12 Stunden nahezu zu einer Verdopplung der Anzahl apoptotischer Kerne, im Vergleich zu unbestrahlten Kontrolle (Abb. 1).

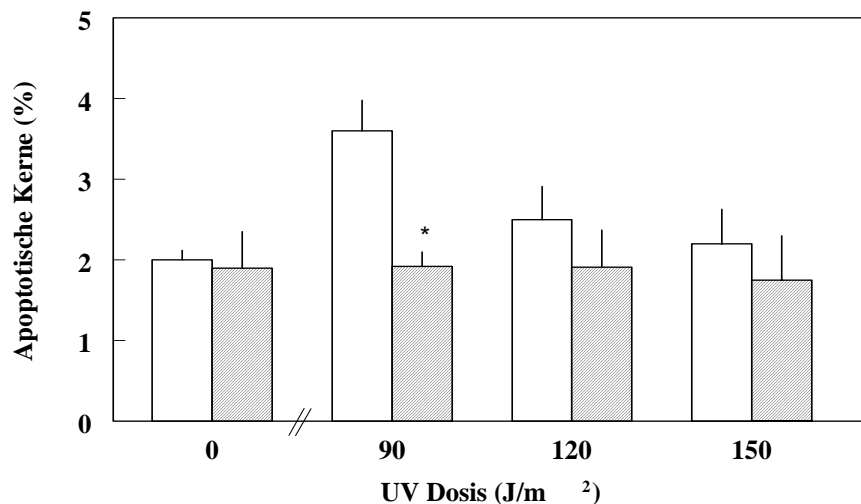


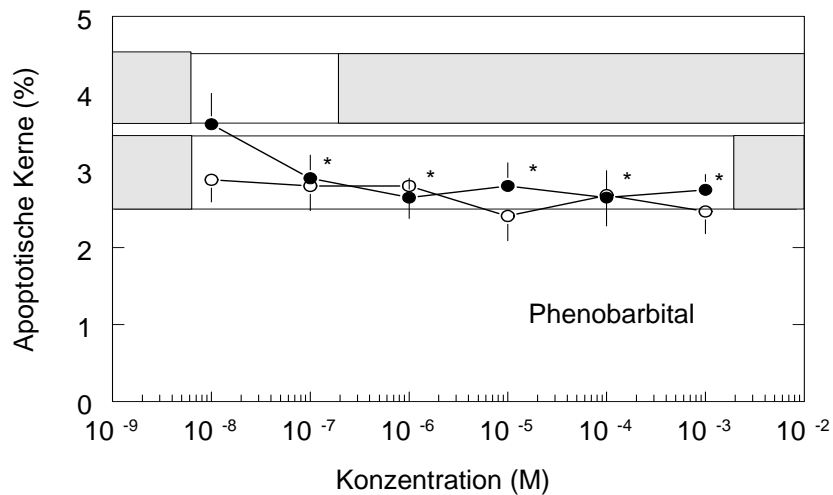
Abbildung 1. Unterdrückung der Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur. Die Kulturen wurden 30 min nach der UV-Bestrahlung mit 0,9%iger NaCl-Lösung (offene Balken) oder 2 mM Phenobarbital (gestreifte Balken) behandelt; die Zahl apoptotischer Kerne wurde 12 h nach der Bestrahlung bestimmt.

Nach 6 bzw. 18 Stunden war die Anzahl apoptotischer Kerne signifikant niedriger (nicht dargestellt). Daher wurde die Anzahl apoptotischer Kerne in der Folge stets 12 Stunden nach UV-Bestrahlung gemessen. Nach einer Strahlendosis von 120 J/m^2 wurden weniger apoptotische Kerne gezählt, während 12 Stunden nach Behandlung mit 150 J/m^2 keine Zunahme apoptotischer Kerne mehr zu verzeichnen war. Die letztgenannte Dosis führte zu massivem, akutem Zelltod (nicht dargestellt), wodurch wahrscheinlich die Entwicklung von Apoptosen verhindert wurde. Phenobarbital, ein Tumorpromotor der Rattenleber, kann das Auftreten von Apoptose in Rattenhepatozyten unterdrücken (17) und wurde daher als Referenzverbindung eingesetzt. Die Zugabe von 2 mM Phenobarbital 30 Minuten nach der UV-Bestrahlung hatte eine völlige Unterdrückung der UV-bedingten Zunahme der Apoptose zur Folge (Abb. 1).

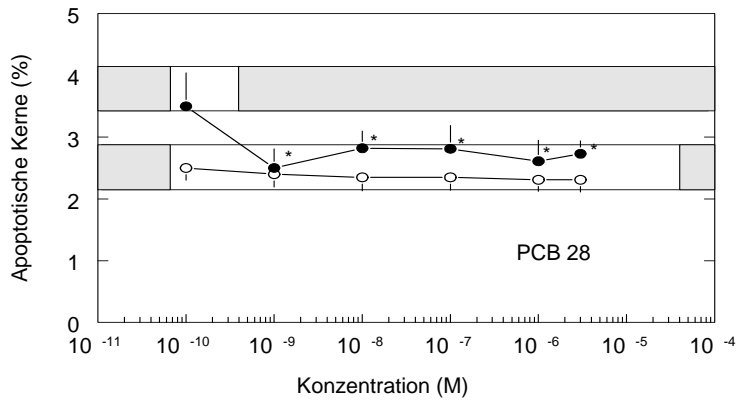
Für weitere Experimente mit den PCB 28, 101 und 187 wurden Standardbedingungen

(einmalige UV-Bestrahlung mit 90 J/m^2 , Bestimmung apoptotischer Kerne 12 Stunden danach) angewandt. Es wurde festgestellt, daß Phenobarbital und die drei untersuchten PCB die UV-bedingte Zunahme apoptotischer Kerne in konzentrationsabhängiger Weise unterdrückten. Diese Wirkung erreichte 90%-Niveau (mindestens 90%ige Unterdrückung der UV-bedingten Apoptose) bei Konzentrationen von 10^{-7} M Phenobarbital, 10^{-9} M PCB 28, 10^{-7} M PCB 101 sowie 10^{-6} M PCB 187. (Abb. 2 A-D), d.h., die Apoptosezahl wurde auf das Niveau der ‚spontanen‘ Apoptose ohne UV-Bestrahlung zurückgedrängt.

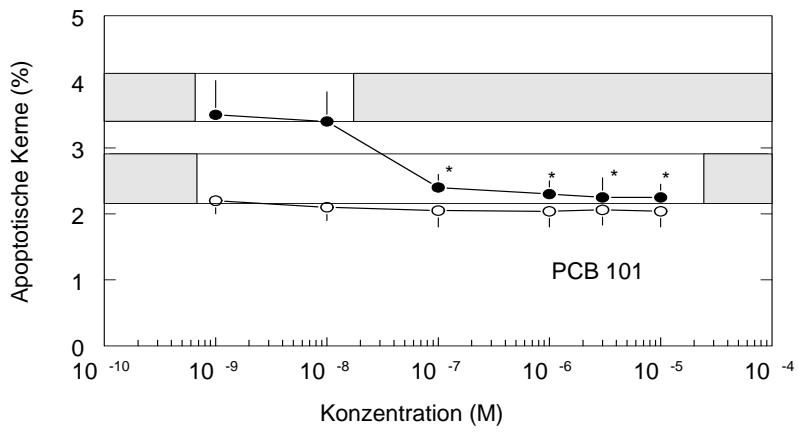
A



B



C



D

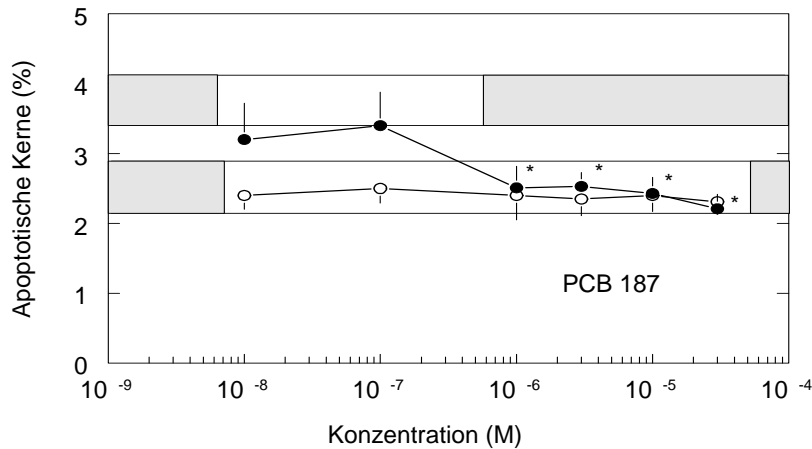
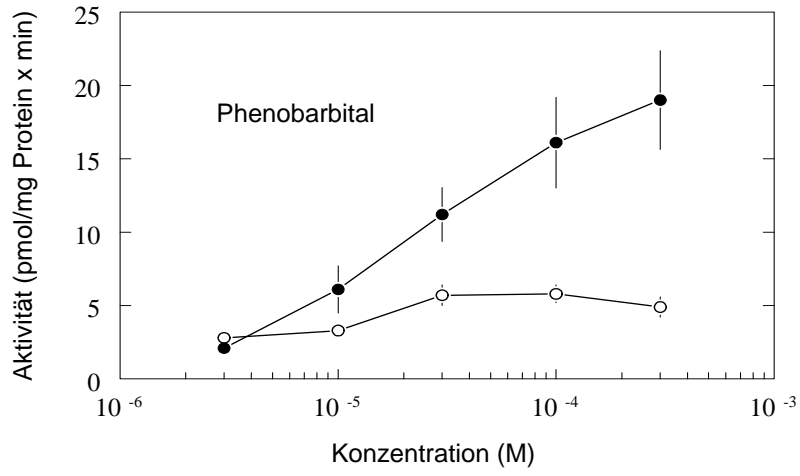


Abbildung 2A-D. Wirkung von Phenobarbital, PCB 28, 101 oder 187 auf die Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur, 12 h nach Bestrahlung mit UV-Licht (90J/m²). Die Verbindungen wurde 30 min nach der Bestrahlung zugegeben. Die Symbole und Fehlerbalken stellen die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen dar.

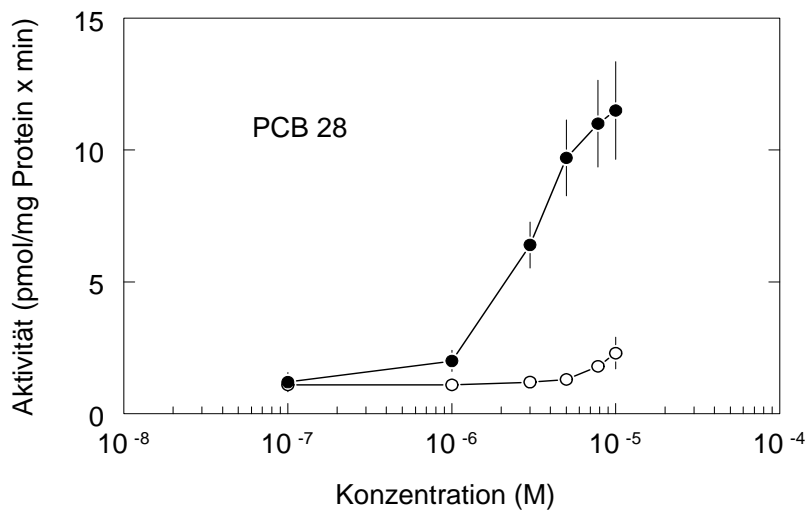
*signifikant abweichend von den Ergebnissen DMSO- bzw. Saline-behandelter Kontrollen, die durch zwei Bänder dargestellt sind ($p \leq 0,05$). Das obere Band zeigt den Standardabweichungs-Bereich der Apoptose in UV-behandelten, das untere Band in unbestrahlten Kulturen.

Alle PCB sowie Phenobarbital führten auch zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der CYP2B1/2B2-katalysierten 7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD)-Aktivität in Zellhomogenaten (Abb. 3 A-D).

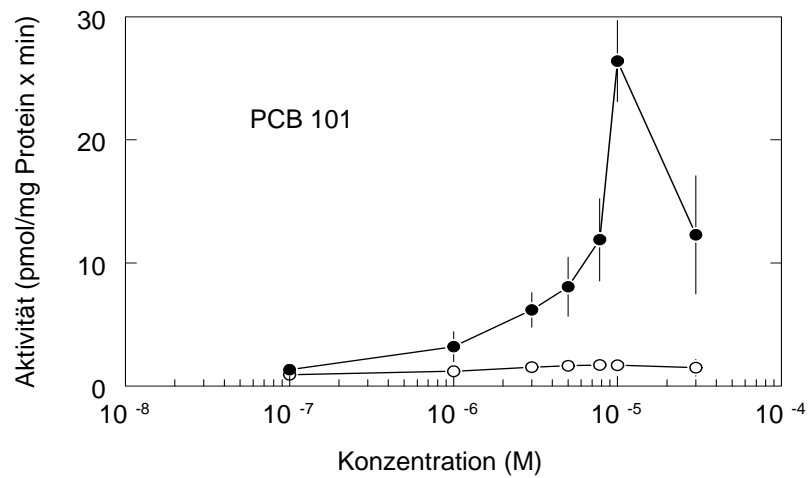
A



B



C



D

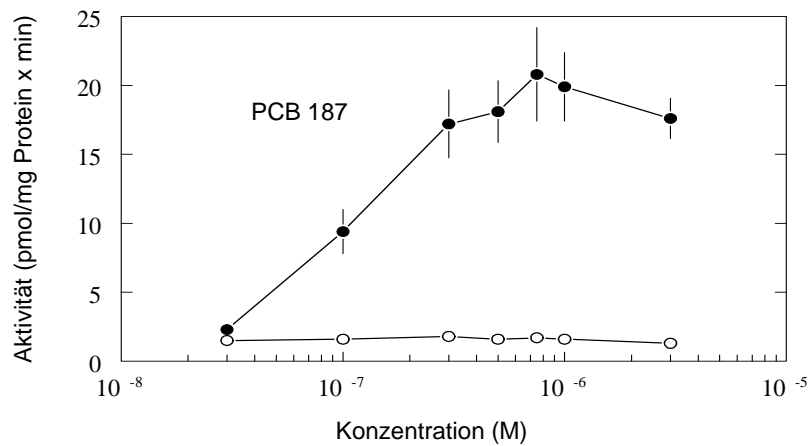


Abbildung 3 A-D. Wirkung von Phenobarbital, PCB 28, 101 oder 187 auf die 7-Ethoxyresorufon-O-deethylase (EROD)- Aktivität (offene Kreise) bzw. die 7-Pentoxyresorufin-O-delakylase (PROD)-Aktivität (geschlossene Kreise) in Rattenhepatozyten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen. 48 h nach Zugabe der Induktoren wurden die Zellen geerntet und homogenisiert und die Enzymaktivitäten bestimmt wie unter ‚Material und Methoden‘ beschrieben. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsreihen (drei verschiedene Zellpräparationen) dar.

Die maximale Wirksamkeit (höchste erreichbare PROD-Aktivität) lag für Phenobarbital und die PCB 101 und 187 im Bereich von 19 – 30 pmol/min x mg Protein, während Behandlung mit PCB 28 eine Aktivität von höchstens 10 – 15 pmol/mn x mg Protein induzierte. Für Phenobarbital wurde eine komplette Induktionskurve für die CYP1A-katalysierte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)- Aktivität erhalten, während die untersuchten PCB die EROD-Aktivität nicht induzierten. Das Anpassen sigmoidaler Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (nicht dargestellt) an die experimentellen Daten mit Hilfe eines log-probit-Verfahrens ermöglichte die Berechnung von EC₅₀-Werten und zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen (Tab. 1). Die induzierende Potenz der PCB als PROD-Induktoren folgte der Rangordnung PCB 187>PCB 28>PCB 101.

Tabelle I. EC₅₀-Werte der Induktion der PROD- bzw. EROD-Aktivität in Homogenaten aus Rattenhepatozyten in Primärkultur nach Behandlung der Zellen mit Phenobarbital, PCB #28, #101 bzw. # 187.

Induktor	PROD-Induktion EC ₅₀ ± S.D. (M)	EROD-Induktion EC ₅₀ ± S.D. (M)	Hemmung (90%) der UV-initiierten Apoptose
Phenobarbital	2,4 x 10 ⁻⁵ ± 0,17 x 10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻⁵ ± 1,2 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
PCB #28	3,3 x 10 ⁻⁶ ± 0,34 x 10 ⁻⁶	-	10 ⁻⁹
PCB #101	5,7 x 10 ⁻⁶ ± 0,97 x 10 ⁻⁶	-	10 ⁻⁷
PCB #187	1,2 x 10 ⁻⁷ ± 0,2 x 10 ⁻⁷	-	10 ⁻⁶

7.5. Diskussion

Die tumorpromovierende Wirkung von PCB und verwandten Umweltschadstoffen stellt einen wesentlichen Parameter bei der Risikobewertung dieser Chemikalien für den Menschen dar. Für einige PCB ist ihre tumorpromovierende Eigenschaft aus Tierexperimenten gesichert. Sie sind damit Mitglieder einer sehr vielgestaltigen und ständig im Zunehmen begriffenen Familie von Stoffen, die das klonale Wachstum von als präneoplastisch eingestufteten Zellen in verschiedenen (Ziel-)Organen steigern können und damit das Risiko einer malignen Entartung erhöhen (12). Über die molekularen Mechanismen, die dieser Wirkung zugrunde liegen, ist nur wenig bekannt. Allerdings existieren diesbezüglich einige Hypothesen, darunter auch diejenige, wonach die Unterdrückung der häufig in präneoplastischen Zellklonen erhöhten Apoptose ein

wesentliches Element der tumorpromovierenden Wirkung sei (13).

Die Überprüfung dieser Hypothese wird im Falle der PCB durch die Tatsache erschwert, dass letztere in Verbindungen mit einem ‚dioxinartigen‘ Muster von biochemischen und toxischen Wirkungen und solche mit ‚nicht-dioxinartigen‘ Wirkungen unterteilt werden können. In vielen Fällen lassen sich jedoch beide Gruppen nicht scharf voneinander abgrenzen, d.h., eine Reihe von Kongeneren weisen sowohl ‚dioxinartige‘ als auch ‚nicht-dioxinartige‘ Wirkungen auf. Mitunter können ‚dioxinartige‘ und ‚nicht-dioxinartige‘ Wirkmechanismen offenbar zum selben toxischen Endpunkt führen. Die Einstufung von non-ortho-substituierten PCB als ‚dioxinartig‘ beruht vor allem auf ihrer agonistischen Wirkung am Ah- oder Dioxin-Rezeptor (AhR). Diese hat eine Reihe charakteristischer molekularer und zellulärer Wirkungen, darunter auch die Induktion von CYP1A-Isoenzymen, zur Folge (1,6). Die bisher diesbezüglich untersuchten ‚dioxinartigen‘ PCB erwiesen sich als tumorpromovierend in der Rattenleber und ähneln darin dem potentesten Agonisten aus der Familie der ‚Dioxine‘, dem 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 10,24).

Auch unter den als ‚nicht-dioxinartig‘ eingestuften PCB wurden einige als tumorpromovierend in der Rattenleber erkannt (1,5,8,9). Mit einem anderen promovierenden Fremdstoff, dem Phenobarbital, haben sie die induzierende Wirkung auf eine Gruppe von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen einschließlich CYP 2B1/2B2 gemeinsam, den sog. ‚Phenobarbital-Typ‘ der Enzyminduktion. Der intrazelluläre Signalweg, der zum ‚Phenobarbital-Typ‘ der Induktion führt, bedient sich offenbar des ‚constitutively active receptor‘ (CAR), der als Transkriptionsfaktor auf ein distal gelegenes responsives Element in Phenobarbital-induzierbaren Genen, das ‚phenobarbital-responsive enhancer module‘ wirkt (25).

In der vorliegenden Studie sollte die Frage eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Induktion von CYP1A- oder CYP2B1/2B2-Aktivitäten und der Unterdrückung der Apoptose als einem möglichen *in vitro*-Surrogat für die tumorpromovierende Wirkung *dieser* Verbindungsklasse geklärt werden.

Es wurde festgestellt, dass Phenobarbital und die drei untersuchten ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB # 28, 101 und 187 die durch UV-Bestrahlung in Rattenhepatozyten in Primärkultur ausgelöste Apoptose vollständig unterdrücken. Ein ähnliches Ergebnis war in einer vorangegangenen Studie mit dem Leber-Tumorpromotor TCDD erzielt worden (17).

Demgegenüber hatten weder TCDD noch die in dieser Studie eingesetzten PCB eine Hemmwirkung auf das Auftreten ‚spontaner‘ Apoptosen, was für das Vorliegen zweier unterschiedlicher Apoptosetypen, der ‚spontanen‘ und der UV-induzierten Apoptose, spricht. Die UV-induzierte Apoptose wird vermutlich durch einen DNA-Schaden und/oder eine andere Form des UV-bedingten Zellstress ausgelöst. In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass UV-Bestrahlung von Hepatozyten zu einer Induktion von p53 führt (26), die eine typische Reaktion auf DNA-Schäden darstellt. Interessanterweise konnte der UV-induzierte Anstieg von p53 durch TCDD oder Phenobarbital nahezu vollständig unterdrückt werden. Der andere Apoptosetyp, hier als ‚spontane‘ Apoptose bezeichnet, ist vermutlich in Hepatozyten *in vitro* häufiger als in der Leber und könnte auf dem durch die Isolierung, das Ausplattieren und die Kultivierung der Zellen bedingten Zellstress beruhen.

Die Analyse der PROD-Aktivität als funktionellem Parameter für CYP 2B1/2B2 zeigt, dass alle untersuchten PCB relativ potente Induktoren dieser Enzyme sind. Im Gegensatz dazu wurde die AhR-regulierte CYP1A-Aktivität (EROD) lediglich durch Phenobarbital, jedoch nicht durch die PCB beeinflusst.

In *in vivo* – Untersuchungen an Ratten (8) wurde die folgende Rangordnung der PROD-induzierenden Potenz in der Leber (vermutlich durch toxikokinetische Einflüsse modifiziert) gefunden: PCB 101 \approx PCB 187 > PCB 28. Diese weicht deutlich von der hier gefundenen *in vitro* - Rangfolge ab, die PCB 187 als etwa zweifach potenter findet als PCB 101. Der Vergleich der EC₅₀-Werte der PROD-Induktion mit den 90%-Werten der Apoptosehemmung ergab keinen Zusammenhang. Dieses Ergebnis ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen legt es nahe, dass die Messung der CYP 2B1/2B2-Induktion als Parameter für eine anti-apoptotische Wirksamkeit von PCB unzureichend sein kann. Zum anderen deutet es darauf hin, dass die Signalwege, die zur Induktion von CYP 2B1/2B2 führen nicht direkt an jene der Apoptosehemmung gekoppelt sind. In der Literatur liegen kaum systematische Untersuchungen zu möglichen Zusammenhängen zwischen der Induktion von CYP-Isoenzymen und einer tumorpromovierenden Wirkung in der Leber vor. Der AhR-Agonist TCDD wirkt tumorpromovierend in der Leber weiblicher aber nicht männlicher Sprague-Dawley-Ratten obwohl in beiden Geschlechtern eine effiziente Induktion von CYP1A-Isoenzymen bzw. –Aktivitäten nachgewiesen werden konnte (27). Andererseits gibt es

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der relativen tumorpromovierenden Potenz und der Induktion von CYP1A in der Leber weiblicher Ratten für die Klasse der 2,3,7,8-substituierten PCDD (2,10). Es erscheint plausibel, dass bestimmte Klassen von AhR-Agonisten in einem bestimmten experimentellen Modell wie z.B. weiblichen Ratten gemäß ihrer Affinität zum Rezeptor tumorpromovierend auf die Leber wirken. Für die divergente Familie der PCB und andere Tumorpromotoren der Rattenleber zeichnen sich ebenfalls einige Zusammenhänge zwischen der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme und der promovierenden Wirkung ab (5,28). Diese Zusammenhänge sind allerdings unvollständig und könnten auf der Existenz verschiedener Mechanismen der Tumorpromotion durch ‚Phenobarbital-artige‘ Induktoren in der Leber beruhen (29). Alternativ könnte ein gemeinsamer Initialmechanismus für alle Stoffe dieser Gruppe existieren, der aber durch die Induktoren selbst unterschiedlich moduliert wird. Zu den wichtigen Modulatoren zählen vor allem adaptive Prozesse, wie z.B. die adaptive Zunahme der Katalase-Aktivität als Antwort auf die vermehrte hepatische Peroxidbildung nach Phenobarbitalbehandlung (18).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse erstmalig, dass ‚nicht-dioxinartige‘ PCB in der Lage sind, die Apoptose in Rattenhepatozyten zu unterdrücken. Ferner, zeigen sie, dass die durch UV-Licht initiierte, aber nicht die ‚spontane‘ Apoptose gehemmt wird und dass die Apoptosehemmung und die CYP-Induktion vom ‚Phenobarbital-Typ‘ unterschiedliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufweisen können. Weiter Experimente müssen klären, welche zelluläre Wirkung entscheidend für die Apoptosehemmung durch ‚nicht-dioxinartige‘ PCB ist und in welchem Zusammenhang sie mit der Tumorpromotion steht.

7.6. Literatur zu ‚7. Ergebnisse‘

1. Safe, S.H. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 87-149.
2. IARC (1997) Polychlorinated Dibenzo-*para*-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to

Humans Vol. 69, Lyon.

3. Kuratsune, M., Nakamura, Y. und Ikeda, M.. (1987) Analysis of deaths seen among patients with Yusho — a preliminary report. *Chemosphere*, **16**, 2085-2088.
4. Jacobson, J.L., Jacobson, S.W. und Humphrey, H.E.B. (1990) Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicol. Teratol.*, **12**, 319-326.
5. Buchmann, A., Ziegler, B, Wolf, A., Robertson, L.W., Durham, S.K. und Schwarz, M. (1991) Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Correlation between primary subcellular effects and promoting activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 454-468.
6. Giesy, J.P. und Kannan, K. (1998) Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **28**, 511-569.
7. Brown, D. P. (1987) Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls: an update. *Arch. Environ. Health*, **42**, 333-339.
8. Connor, K. et al. (1995) Structure-dependent induction of CYP2B by polychlorinated biphenyl congeners in female Sprague-Dawley rats. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1913-1920.
9. Hemming, H., Flodström, Wäringård, L., Bergman, Å, Kronevi, T., Nordgren, I. und Ahlborg, U.G. (1993) Relative tumor promoting activity of three polychlorinated biphenyls in rat liver. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol.*, **248**, 163-174.
10. Schrenk, D., Buchmann, A., Dietz, K., Lipp, H.-P., Brunner, H., Sirna, H., Münzel, P., Hagenmaier, H., Gebhardt, R. und Bock, K.W. (1994) Promotion of preneoplastic foci in rat liver with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin, and a defined mixture of 49 polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Carcinogenesis*, **15**, 509-515.
11. Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg, Jr., E.F. und Klaunig, J.E. (1996) Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis*, **17**, 947-954.
12. Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Kraupp-Grasl, B., Oberhammer, F., Wagner, A. und Jirtle, R. (1993) Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. *Environ. Health Perspect.* **101** (Suppl. 5), 87-90.
13. Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J. und Schulte-Hermann, R. (1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative

- preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis*, **5**, 453-45
14. Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K.W. und Schwarz, M. (1995) Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis*, **16**, 1271-1275.
 15. Plant, N.J., Horley, N.J., Dickins, M., Hasmall, E., Elcombe, C.R. und Bell, D.R. (1998) The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis is differentially regulated by the liver growth agents, phenobarbital and methylclofenapate. *Carcinogenesis*, **19**, 1521-1527.
 16. Bayly, A.C., Roberts, R.A. und Dive, C. (1994) Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J. Cell Biol.*, **125**, 197-203.
 17. Wörner, W. und Schrenk, D. (1996) Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor β 1. *Cancer Res.*, **56**, 1272-1278.
 18. Diez-Fernandez, C., Sanz, N., Alvarez, A.M., Wolf, A. und Cascales, M. (1998) The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate, on the relationship between reactive oxygen species, antioxidant enzyme expression and apoptosis. *Carcinogenesis*, **19**, 1715-1722.
 19. Buchmann, A., Willy, C., Buenemann, C.L., Stroh, C., Schmiechen, A. und Schwarz, M. (1999) Inhibition of transforming growth factor beta 1 - induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity. *Cell Death Diff.*, **6**, 190-200.
 20. Schrenk, D., Karger, A., Lipp, H.-P. und Bock, K.W. (1992) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and ethinylestradiol as comitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, **13**, 453-456.
 21. Seglen, P.O. (1976) Preparation of isolated liver cells. *Meth. Cell Biol.*, **13**, 29-83.
 22. Dunn, J.C.Y., Tompkins, R.G. und Yarmush, M.L. (1992) Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for posttranscriptional and translational regulation. *J. Cell Biol.*, 116
 23. Burke, M.D. und Mayer, R.T. (1983) Differential effect of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). *Chem. -Biol. Interact.*, **45**, 243-258.
 24. Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Campbell, H.A. und Poland, A. (1980) Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, **40**, 3616-3620.

25. Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K. und Negishi, M. (1999) Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6318-6322.
26. Wörner, W. und Schrenk, D. (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses apoptosis and leads to hyperphosphorylation of p53 in rat hepatocytes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **6**, 239-247
27. Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreon, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnins, R.P., Frauson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., Hummel, R.A. und Humiston, C.G. (1978) Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 279-303.
28. Rice, J.M., Diwan, B.A., Hu, H., Ward, J.M., Nims, R.W. und Lubet, R.A. (1994) Enhancement of hepatocarcinogenesis and induction of specific cytochrome P450-dependent monooxygenase activities by the barbiturates allobarbitol, aprobarbitol, pentobarbitol, secobarbitol, and 5-phenyl- and 5-ethylbarbituric acids. *Carcinogenesis*, **15**, 395-402.
29. Whysner, J., Ross, P.M. und Williams, G.M. (1996) Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.*, **71**, 153-191.

8. voraussichtlicher Nutzen, insbesondere praktische Verwertbarkeit der Ergebnisse und Erfahrungen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß an der Rattenleber tumorpromovierende ‚nicht-dioxinartige‘ PCBs ebenfalls die Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur hemmen können. Damit besteht Anlaß zu der Hoffnung, daß sich in Zukunft ein Großteil der an der Rattenleber tumorpromovierenden Stoffe in einem in vitro-Test prüfen läßt. Dadurch könnte es zu einer erheblichen Einsparung von Tierexperimenten und zu einer deutlichen Kostensenkung bei der Prüfung bzw. Entwicklung von Arzneimitteln und Chemikalien kommen. Nach Informationen des Zuwendungsempfängers werden bereits Entwicklungen entsprechender Testverfahren in kommerziellen Prüflaboratorien vorgenommen.

Ferner wurde gezeigt, daß es im Modell der Rattenhepatozyten in Sandwichkultur möglich ist, die Apoptosehemmung durch PCBs zu simulieren. In diesem sehr gut kontrollierbaren in vitro-Modell sind damit mechanistische Forschungen zur

Apoptosehemmung, insbesondere mit Hinblick auf die Frage der Extrapolierbarkeit auf den Menschen, möglich.

Die Arbeiten wurden anlässlich mehrerer nationaler und internationaler Tagungen vorgestellt. Eine Originalpublikation ist in Vorbereitung. Ferner haben die Ergebnisse mittelbar Einfluß auf Beiträge des Antragstellers zum internationalen risk assessment für Dioxine, PCBs und verwandte Umweltschadstoffe gehabt.

9. während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekanntgewordene Fortschritte auf diesem Gebiet bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens sind keine Fortschritte bei anderen zur Frage der Apoptosehemmung durch PCBs bekannt geworden. Demgegenüber besteht eine intensive Forschungsaktivität zur Frage der durch Phenobarbital und Induktoren des Fremdstoffmetabolismus vom ‚Phenobarbital-Typ‘ ausgelösten Signalketten. Hierbei hat die Gruppe um Negishi durch Identifizierung eines Phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM) in der 5'-flankierenden Region des phenobarbital-induzierbaren CYP2B6-Gens und des dort aktivierenden Transkriptionsfaktors CAR erhebliche Fortschritte gemacht (Honkakoski und Negishi, 2000). Insbesondere wurden Hinweise darauf erhalten, daß Änderungen des Phosphorylierungsstatus von CAR seine Translokation aus dem Cytoplasma in den Zellkern möglich machen.

Ferner konnte die Gruppe um Guillouzo (Rennes) zeigen, daß die Induktion vom ‚Phenobarbital-Typ‘ in Zellkulturen vom Influx bzw. der Mobilisierung von Calcium-Ionen abhängig ist und möglicherweise durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II vermittelt wird (Marc et al., 2000).

10. Literatur, sonstige

Bayly A, Roberts R und Dive C (1994) Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopine. J Cell Biol **125**, 197-201

Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J und

Schulte-Hermann R (1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* **5**, 43-49

Honkakoski P, Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**, 321-337

Marc N, Galisteo M, Lagadic-Gossmann D, Fautrel A, Jonnard F, Guillouzo A, und Corcos L (2000) Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocytes. *Eur J Biochem* **267**, 963-970

Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G und Bursch (1990) DNA synthesis, apoptosis and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res* **50**, 5127-5134

Stinchcombe S, Buchmann A, Bock KW und Schwarz M (1995) Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. *Carcinogenesis* **16**, 1271-1275

Wörner W und Schrenk D (1996) Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light and transforming growth factor β 1. *Cancer Res* **56**, 1272-1276

11. erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse (einschließlich Arbeiten mit thematischem Bezug)

Van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W und Younes M (2000) Dioxins: WHO' tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* **40**, 1095-1101

Van den Berg M, van Birgelen A, Birnbaum L, Brouwer B, Carrier G, Conolly R, Dragan Y, Farland W, Feeley M, Fürst P, Galli C, de Gerlache J, Grieg J, Hayashi Y, Hayashi Y, Herrman J, Kogevinas M, Kurokawa Y, Larsen JC, Liem D, Luijckx L, Matsumura F, McGregor D, Mocarelli P, Moore M, Moy G, Newhook R, Ouane F, Peterson R, Poellinger L, Portier C, Rappe C, Rogan W, Schrenk D, Shkolenok G, Sweeney M, Tohyama C, Tuomisto J, Ueda H, Waters J, van de Wiel J, van Leeuwen FXR, Younes M und Zeilmaker M (2000) Revision of the tolerable daily intake of dioxin by WHO. *Food Add Contam* **17**, 223-240

Dragan YP und Schrenk D (2000) Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. Food Addit Contamin **17**, 289-302

Van den Berg M, Peterson RE und Schrenk D (2000) Human risk assessment and TEFs. Food Addit Contamin **17**, 347-358

Bohnenberger S, Wagner B, Schmitz H-J und Schrenk D (2000) Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with ‚non-dioxin-like‘ polychlorinated biphenyls. Carcinogenesis **22**, 1601-1606

Abstracts

Wagner B, Bohnenberger S, Grün A, Zankl H und Schrenk D (2000) Einfluss von ‚nicht-dioxinartigen‘ polychlorierten Biphenylen auf die CYP2B1/2-Aktivität und die Apoptose in Hepatozyten der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **361**

Zeiger M, Schmitz H-J und Schrenk D (2000) CYP1A-induzierende Potenz polychlorierter Biphenyle in der menschlichen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **361**

Zeiger M, Schmitz H-J und Schrenk D (2000) CYP1A-induzierende Potenz polychlorierter Biphenyle in der menschlichen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2. Lebensmittelchem Ges, Regionaltagung Südwest, Karlsruhe, April 2000

Zeiger M, Benz A, Schmitz H-J und Schrenk D (2000) Induction of CYP1A isozymes in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE and rat primary hepatocytes by ‚dioxin-like‘ polychlorinated biphenyls (PCBs). Comparison of potencies. Organohalogen Compounds **49**