

**Themenkreis: Oxidativer Stress**  
**Teilprojekt „Aktivität der Cytochrom P450 Monooxygenase-Systeme in**  
**Dauerzelllinien verschiedener Fischarten“**

**Hintergrund**

Der oxidative Metabolismus von Fremdstoffen ist häufig der erste Schritt in der Entgiftung von Umweltchemikalien. Diese oxidativen Stoffwechselwege werden gewöhnlich von Enzymen aus der Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert, welche den wichtigen Schritt der Biotransformation der meisten lipophilen Fremdstoffe, einschliesslich einer grossen Menge an Schadstoffen in der aquatischen Umwelt, einleiten. Diese Enzyme stellen eine recht grosse Familie von Häm-Proteinen dar, welche Medikamente, Karzinogene oder Pestizide verstoffwechseln. Das Verständnis der Aktivität der CYP P450 Monooxygenasen in aquatischen Lebewesen ist essentiell zur Aufklärung der Wirkungsweise derartiger aquatischer Schadstoffe.

Während einerseits diese Enzyme viele organische Schadstoffe metabolisieren können, werden sie gleichzeitig auch durch diese reguliert. Eine Regulation wird häufig deutlich als eine Induktion festgestellt oder als ein Anstieg der Monooxygenase-Aktivität nach Einwirkung eines spezifischen Fremdstoffes. Die Induktion von CYP P450 Enzymen wird in daher häufig als ein Biomarker für die Exposition mit Umweltchemikalien angesehen.

Die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase (AHH) und die Ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) Aktivitäten werden bekanntermassen durch bestimmte Isoformen der CYP P450 Enzyme katalysiert und ihre Aktivitäten werden in verschiedenen Fischarten durch aromatische Kohlenwasserstoffe und polychlorierte Biphenyle<sup>1</sup> induziert. Derartige Induktoren der AHH and EROD Aktivitäten in Fischen wurden in Verbindung gebracht mit bestimmten CYP P450 Formen, die aus verschiedenen Arten isoliert wurden. Die jeweilige Biotransformation von bestimmten Modellsubstraten kann daher die Präsenz von bestimmten Enzymformen in Fischzellen verifizieren.

**Ziel**

Das Ziel der Studie ist die Beurteilung der Aktivität der CYP P450 Monooxygenasen über die Aktivitätsbestimmung der EROD in verschiedenen Zelllinien aus Fischen. Um verschiedene Isoformen der CYP P450 zu unterscheiden sollen ebenfalls nahverwandte Substrate des Ethoxyresorufin (ER), wie das Pentoxyresorufin (PR) und das Ethoxycoumarin (EC) verwendet werden, um die Aktivitäten der Pentoxyresorufin-o-Dealkylase (PROD) bzw. der Ethoxycoumarin-o-Deethylase (ECOD) zu ermitteln. Dies dient der weiteren Aufklärung von Wirkmechanismen von schädlichen Fremdstoffen und erweitert das Verständnis von bereits beobachteten Sensitivitätsunterschieden der verschiedenen Zellen gegenüber den unterschiedlichsten Xenobiotica.

**Einzusetzende Methode**

In Säugern wurde bereits die Induktion durch die 3-Methylcholanthren (3-MC), Phenobarbital (PB), Pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitril (PCN) und Isosafrol gezeigt<sup>2</sup>. 3-MC scheint dabei auch für aquatische Lebewesen geeignet<sup>3,4</sup>, da es zur Neusynthese der CYP P450 in Fischen führt<sup>5</sup>. PB führt jedoch nur in einigen Arten zu einer Stoffwechselantwort<sup>6,7</sup>, so dass vermutet werden kann, dass im Gegensatz zu Säugern PB-metabolisierende Enzyme fehlen. Dennoch sollen in den geplanten Untersuchungen alle genannten Substanzen eingesetzt werden und auf ihre Fähigkeit zur Induktion der CYP P450 hin evaluiert werden. Zur Zielerreichung ist geplant den Zellen nach Inkubation dieser mit den möglichen Induktoren die verschiedenen Substrate für CYP P450 Monooxygenasen (ER, PR, EC) anzubieten und über unterschiedliche fluorimetrische Messmethoden<sup>8,9</sup> die Induktion der Umsetzung dieser Testsubstrate zu überwachen.

Bisher nur in Säugern wurde gezeigt, dass auch Mycotoxine, wie das Aflatoxin B1, die CYP P450 aktivieren können<sup>10</sup>. Ob dies in Fischen möglich ist, wurde bisher nicht untersucht und soll daher in einem zweiten Versuchsteil evaluiert werden. Ebenfalls unbekannt ist auch noch, ob typische *Fusarium*-Mycotoxine wie Deoxynivalenol (DON) oder Zearalenol (ZON) auf die CYP P450 Aktivitäten in Fischzellen wirken können. Durch derartige Untersuchungen wird somit ein entscheidender Beitrag für die Abschätzung der potentiellen Wirkung dieser Mycotoxine auf Fischzellen geleistet.

### **Stand der Vorarbeiten und Projektablauf**

Mit der Masterarbeit kann ab September 2010 begonnen werden. Die Dauerzellkulturen der Leber, Kieme und Gonade der Regenbogenforelle und aus Kopfnierenzellen von Lachsen, sowie eine Hirnzelllinie aus Karpfen sind bereits vorhanden.

### **Voraussetzungen**

Naturwissenschaftliches Grundverständnis ist erforderlich und Laborpraxis wäre erwünscht. Erfahrung mit ökotoxikologischen Testsystemen und Zellkulturen ist vorteilhaft, aber nicht zwingend notwendig.

### **Betreuung und weitere Informationen:**

Prof. Dr. Patricia Holm, Programm MGU, Vesalgasse 1, 4051 Basel, 061 267 04 02,  
[patricia.holm@unibas.ch](mailto:patricia.holm@unibas.ch)

Dr. Constanze Pietsch, Programm MGU, Vesalgasse 1, 4051 Basel, 061 267 04 05,  
[constanze.pietsch@unibas.ch](mailto:constanze.pietsch@unibas.ch)

- 1 – Stegeman, J. 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Gelboin, H., Tsò, P.O.P (eds) Polycyclic hydrocarbons and cancer. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 1-60.
- 2 – Ryan, D. E., Thomas, P. E., and Levin, W. Hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with isosafrole. J. Biol. Chem. 255: 7941-7955 (1980).
- 3 – Stegeman, J. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol. 3 (H. Gelboin and P. O. P. Ts'o, Eds.), Academic Press, New York, 1981, pp. 1-60.
- 4 – Lech, J. J., Vodnick, M. J., and Elcombe, C. R. Induction of monooxygenase activity in fish. In: Aquatic Toxicology (L. J. Weber, Ed.), Raven Press, New York, 1982, Chapt. 3, pp. 107-148.
- 5 – Klienow, K., Melancon, M. J., and Lech, J. J. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. Environ. Health Perspect. 71: 105-119 (1987).
- 6 – Pohl, R., Bend, J., Guarino, A., and Fouts, J. Hepatic microsomal mixed-function oxidase activity of several marine species from coastal Maine. Drug Metab. Disp. 2: 545-555.
- 7 – Burns, K. A. Microsomal MF(O in an estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*, and their induction as a result of environmental contamination. Comp. Biochem. Physiol. 53B: 443-446 (1976).
- 8 – Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N.C., Segner, H. 1998: Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. Mar. Environ. Res. 46 (1-5): 369-373.
- 9 – Gagnaire, B., Geffard, O., Noury, P., Garric, J. 2009 : In vivo indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. Environ. Toxicol. 2009
- 10 – Stegeman, J., Lech, J.J. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Environ. Health Perspec. 90, 101-109.

- 1 – Stegeman, J. 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Gelboin, H., Tsò, P.O.P (eds) Polycyclic hydrocarbons and cancer. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 1-60.
- 2 – Ryan, D. E., Thomas, P. E., and Levin, W. Hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with isosafrole. *J. Biol. Chem.* 255: 7941-7955 (1980).
- 3 – Stegeman, J. Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol. 3 (H. Gelboin and P. O. P. Ts'o, Eds.), Academic Press, New York, 1981, pp. 1-60.
- 4 – Lech, J. J., Vodick, M. J., and Elcombe, C. R. Induction of monooxygenase activity in fish. In: Aquatic Toxicology (L. J. Weber, Ed.), Raven Press, New York, 1982, Chapt. 3, pp. 107-148.
- 5 – Klienow, K., Melancon, M. J., and Lech, J. J. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environ. Health Perspect.* 71: 105-119 (1987).
- 6 – Pohl, R., Bend, J., Guarino, A., and Fouts, J. Hepatic microsomal mixed-function oxidase activity of several marine species from coastal Maine. *Drug Metab. Disp.* 2: 545-555.
- 7 – Burns, K. A. Microsomal MF(O in an estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*, and their induction as a result of environmental contamination. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B: 443-446 (1976).
- 8 – Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N.C., Segner, H. 1998: Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. *Marine Environ. Res.* 46 (1-5): 369-373.
- 9 – Gagnaire, B., Geffard, O., Noury, P., Garric, J. 2009 : In vivo indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. *Environ. Toxicol.* 2009
- 10 – Stegeman, J., Lech, J.J. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspec.* 90, 101-109.