

Abschlussbericht zum Vorhaben

„Synkanzerogene Wirkung von UV-Strahlung und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen?

– Mechanistische Studie –“ (FB-0275 B)

Laufzeit

01.06.2019 – 31.03.2022

Bericht vom 11.11.2022

Autorin/Autoren

Simone Schmitz-Spanke

Christian Kersch

Viktor Masutin

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Inhaltsverzeichnis.....	2
Kurzfassung deutsch.....	3
Kurzfassung englisch	4
1. Problemstellung	5
2. Forschungszweck/-ziel	6
3. Methodik	7
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens.....	9
Toxikologische Endgrößen; in vitro	9
Toxikologische Endgrößen; ex vivo	14
Metabolomics; in vitro	17
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen	19
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen	22
Toxikologische Endgrößen; in vitro – ex vivo	22
Metabolomics; in vitro	22
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan	24
8. Anhang/Anhänge	25
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte	25
9. Literatur.....	25
10. Legenden, Abbildungen und Tabellen	26

Kurzfassung deutsch

Ziele:

In dem Projekt sollte eine mögliche Synkanzerogenese von UV-Strahlung und Benzo[a]pyren (B[a]P) in zwei verschiedenen Hautmodellen (KeratiSens™-/U937-Zellen und humane ex vivo Haut) mechanistisch untersucht werden. Dafür wurden die Hautmodelle gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen mit/ohne UV-Strahlung exponiert. DNA-Schädigung und –Reparatur, mögliche zugrunde liegende Mechanismen wie oxidativer Stress und Veränderungen der zellulären Stoffwechselwege (Metabolomics) wurden u.a. untersucht. Eine Benchmark-Dosis (BMD)-Berechnung wurde durchgeführt, um den Beginn eines adversen Effektes zu quantifizieren.

Methoden:

Exposition: Beide Modelle wurden gegen einen B[a]P-Konzentrationsbereich mit/ohne UV-Bestrahlung exponiert, um einen möglichen Übergang von einer adaptiven zu einer adversen zellulären Antwort abbilden zu können.

Methoden:

In vitro – (1) Überprüfung der zeit- und dosisabhängigen Aufnahme und Metabolisierung von B[a]P mittels Fluoreszenzspektrometrie; (2) Normierung der Resultate auf lebende Zellen; (3) Überprüfung der Aktivität verschiedener Enzyme (CYP [Cytochrom P450], NQO1 [NAD(P)H Quinone Dehydrogenase]), der Lebensfähigkeit (LDH [Laktatdehydrogenase]), des zellulärer Stoffwechsels (MTT), der Energiebereitstellung (MMP [mitochondriales Membranpotential]), des oxidativen Gleichgewichts (ROS [reaktive Sauerstoffspezies]; Verhältnis reduziertes/oxidiertes Glutathion; Lipidperoxidation; Aktivierung des Keap1-Nrf2-ARE Signalwegs in KeratiSens™-Zellen) und der DNA-Schädigung/-Reparatur (γ H2AX [DNA-Reparatur]; Comet [DNA-Schädigung]) in den exponierten Zellen über den gesamten Dosisbereich; (4) Modellierung der Daten (BMD)

Ex vivo – (1) CYP450, NQO1; (2) LDH, MTT; (3) red./ox. Glutathion; Lipidperoxidation; (4) γ H2AX; (5) BMD

Metabolomics – (1) Identifizierung regulierter Stoffwechselprodukte mittels *untargeted* Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)-Analyse *in vitro* als Hinweis auf veränderte Stoffwechselwege infolge der Exposition; (2) biostatistische/-informatische Auswertung (MetaboAnalyst)

Ergebnisse und Schlussfolgerung:

In vitro - Bei beiden Zelllinien hatte B[a]P allein einen geringen Einfluss auf die gemessenen Parameter, während die kombinierte UV- und B[a]P-Exposition teilweise eine synergistische Wirkung zeigte. Die BMD-Werte der meisten Endpunkte lagen zwischen 0,005-0,05 μ M B[a]P. Die BMD-Werte für genotoxische Endpunkte lagen bei deutlich niedrigeren B[a]P-Konzentrationen. Die Induktion der DNA-Reparatur (γ H2AX) war der empfindlichste Endpunkt mit BMD-Werten von 0,0006 μ M B[a]P (KeratiSens™) und 0,001 μ M B[a]P (U937).

Ex vivo – In den gemessenen Parametern trat kein synergistischer Effekt auf. Die kombinierte B[a]P/UV-Exposition führte zur niedrigeren γ H2AX-Werten gegenüber alleiniger B[a]P-Behandlung und zu höheren Werten gegenüber alleiniger UV-Bestrahlung. Der BMD-Wert für γ H2AX nach alleiniger B[a]P-Behandlung lag bei ca. 0,13 ng/cm².

Metabolomics – Die kombinierte Exposition führte zu einer vermehrten Regulation von Stoffwechselprodukten bei niedrigeren B[a]P-Konzentrationen als die alleinige B[a]P-Exposition. Die statistische Analyse zeigte eine klare Trennung der regulierten Metabolite in Abhängigkeit von der Exposition. In KeratiSens™-Zellen gehörten u.a. Glutathion, Adenosinmonophosphat und L-Aspartat zu den Metaboliten, die die bestrahlten und exponierten Zellen am stärksten von den Kontrollzellen diskriminierten. Glutathion ist die wichtigste antioxidative Abwehr, Adenosinmonophosphat und L-Aspartat sind neben anderen Funktionen in der DNA-Synthese involviert

In beiden Modellen wurde der oxidative Haushalt belastet, allerdings deutlich geringer in der ex vivo Haut. Bzgl. DNA-Schädigung waren die Reaktionen in den Modellen unterschiedlich. In der ex vivo Haut hatte die alleinige B[a]P-Exposition den stärksten Effekt auf die DNA-Reparatur. Die B[a]P + UV-Exposition hatte dagegen geringere Effekte, was unter den untersuchten Versuchsbedingungen für keinen synergistischen Effekt bzgl. der DNA-Schädigung spricht. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Kurzfassung englisch

In this project, a possible syncarcinogenesis of UV radiation and benzo[a]pyrene (B[a]P) in two different skin models (KeratinoSensTM-/U937 cells and human ex vivo skin) should be investigated from a mechanistic point of view. For this purpose, the skin models were exposed to different B[a]P concentrations with/without UV radiation. DNA damage and repair, possible underlying mechanisms such as oxidative stress, and changes in cellular metabolic pathways (metabolomics) were investigated. A benchmark dose (BMD) calculation was performed to quantify the onset of an adverse effect.

Methods:

Exposure: Both skin models were exposed to a range of B[a]P concentrations with/without UV irradiation to map a possible transition from an adaptive to an adverse cellular response.

Methods:

In vitro - (1) time- and dose-dependent uptake and metabolism of B[a]P by fluorescence spectrometry; (2) normalization of results to living cells; (3) assessment of the activity of various enzymes (CYP [cytochrome P450], NQO1 [NAD(P)H quinone dehydrogenase]), viability (LDH [lactate dehydrogenase]), cellular metabolism (MTT), energy generation (MMP [mitochondrial membrane potential]); (4) oxidative stress (ROS [reactive oxygen species]; ratio reduced/oxidized glutathione; lipid peroxidation; activation of Keap1-Nrf2-ARE pathway in KeratinoSensTM), and DNA damage/repair (γ H2AX [DNA repair]; Comet [DNA damage]); (6) data modeling (BMD).

Ex vivo - (1) CYP450, NQO1; (2) LDH, MTT; (3) red./ox. glutathione; lipid peroxidation; (4) γ H2AX; (5) BMD.

Metabolomics - (1) identification of regulated metabolites by untargeted gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis in vitro as an indication of altered metabolic pathways in response to exposure; (2) biostatistical/informatic analysis (MetaboAnalyst).

Results:

In vitro - In both cell lines, B[a]P alone had a minor effect on the measured parameters, whereas combined UV and B[a]P exposure showed a partial synergistic effect. BMD values for most endpoints ranged between 0.005-0.05 μ M B[a]P. BMD values for genotoxic endpoints were at significantly lower B[a]P concentrations. Induction of DNA repair (γ H2AX) was the most sensitive endpoint with BMD values of 0.0006 μ M B[a]P (KeratinoSensTM) and 0.001 μ M B[a]P (U937).

Ex vivo - No synergistic effect occurred in the measured parameters. Combined B[a]P/UV exposure resulted in lower γ H2AX values compared with B[a]P treatment alone and higher values compared with UV irradiation alone. The BMD value for γ H2AX after B[a]P treatment alone was approximately 0.13 ng/cm².

Metabolomics - Combined exposure results in increased regulation of metabolites at lower B[a]P concentrations than B[a]P exposure alone. Statistical analysis indicated a clear separation of the regulated metabolites as a function of exposure. In KeratinoSensTM cell, glutathione, adenosine monophosphate, and L-aspartate were the metabolites that most discriminated the irradiated and exposed cells from control cells. Glutathione is the major antioxidant defense, and adenosine monophosphate and L-aspartate are involved in DNA synthesis, among other functions.

In both models, the oxidative balance was stressed, but significantly less in the ex vivo skin. With regard to DNA damage, the responses in the models were different. In the ex vivo skin, B[a]P exposure alone had the strongest effect on DNA repair. In contrast, B[a]P + UV exposure had lesser effects, indicating no synergistic effect on DNA damage under the experimental conditions studied. Further investigations are necessary in this field.

1. Problemstellung

Beschäftigte können während ihrer beruflichen Tätigkeit gegen UV-Strahlung und gegen polyzyklische aromatische Kohlenstoffe (PAK) exponiert sein. Beide Gefahrstoffe können Hautkrebs induzieren. Plattenepithelkarzinome oder multiple aktinische Keratosen der Haut durch natürliche UV-Strahlung können nach Nr. 5103 der Anlage zur Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) als Berufskrankheit anerkannt und entschädigt werden, Hautkrebs oder zur Krebsbildung neigende Hautveränderungen durch Ruß, Rohparaffin, Teer, Anthrazen, Pech oder ähnliche Stoffe nach Nr. 5102 der BKV. Diese Destillationsprodukte enthalten wiederum polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die in Tierversuchen teilweise Hauttumore induzieren. Benzo[a]pyren (B[a]P), Leitsubstanz der PAK und im Hinblick auf Kanzerogenität und Mutagenität bestens untersucht, wirkt nach Metabolisierung kanzerogen. UV-Bestrahlung regt B[a]P zusätzlich photochemisch an.

Demnach sind die theoretischen Grundlagen für eine Synkanzerogenese gegeben. Die synkanzerogene Wirkung von beruflich bedingter natürlicher UV-Strahlung und dem beruflich bedingten Kontakt zu PAK bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen wurde aber bisher nicht ausreichend wissenschaftlich untersucht, um als Grundlage für Entscheidungen bei Zusammenhangsbegutachtungen von Berufskrankheiten oder von Sozialgerichten zu dienen. Studien zur Dosis-Wirkungs-Beziehung und zu mechanistischen Grundlagen sind erforderlich um zu klären, ob es eine Synkanzerogenese gibt und wenn ja, ab welchen Konzentrationen der Gefahrstoffe adverse Effekte zu erwarten sind.

2. Forschungszweck/-ziel

Für die Risikobewertung einer möglichen Synkanzerogenese werden Informationen über die Konzentration eines möglichen kanzerogenen Gefahrstoffs in der Haut benötigt. Daher soll die Konzentration, Metabolisierung und Lokalisation von B[a]P konzentrationsabhängig in der Haut unter UV-Strahlung untersucht werden. Außerdem müssen kanzerogene Endpunkte in Abhängigkeit von B[a]P-Konzentrationen unter UV-Strahlung überprüft werden, um eine eventuelle kanzerogene Konzentration mit Bedingungen am Arbeitsplatz vergleichen zu können. Die biologischen Effekte sollten mechanistisch erklärbar sein. Da bisher geeignete Studien zu diesen Aspekten fehlen, soll in dem beantragten Vorhaben eine mechanistische Studie erste Daten für eine Risikobewertung liefern.

Dafür wurden Zellen (KeratinoSens™ und U937) und ex vivo (explantierte) humane Haut gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen mit/ohne UV-Strahlung exponiert. Als positive Kontrolle wurde 8-Methoxypsoralen (8-MOP) ebenfalls mit/ohne UV-Strahlung eingesetzt. In den Zelllinien wurde die Aufnahme und Metabolisierung von B[a]P mit/ohne UV-Bestrahlung analysiert, da B[a]P erst nach der Metabolisierung zu einem ultimalen Kanzerogen mit DNA und anderen Makromolekülen interagiert. In weiteren Untersuchungen wurden dosisabhängige Änderungen verschiedener toxikologischer Endgrößen erfasst, um die mechanistischen Grundlagen einer möglichen Zell- und/oder DNA-Schädigung zu beschreiben. Zusätzlich wurde in einem untargeted metabolomischen Ansatz die zelluläre Stoffwechselsituation der Zellen, um die Regulationen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Expositionsszenarien analysieren zu können. Die Daten wurden mit verschiedenen Verfahren (z.B. multivariate Datenanalyse, Benchmark-Dosis) ausgewertet. Dadurch soll der Übergang von einem adaptiven in einen adversen Zustand beschrieben werden. Die Benchmark-Analyse ermöglicht eine Quantifizierung der B[a]P-Konzentration, ab der eine toxikologische Endgröße um ein bestimmtes Maß von den Kontrollbedingungen abweicht, was einen Vergleich der verschiedenen Expositionsszenarien ermöglicht.

3. Methodik

Tabelle 1: Arbeits-/Zeitplan

Arbeitspakete	2019			2020			2021			2022													
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
Arbeitspaket 0																							
Dosisfindung (B[a]P, UV)	█	█	█	█				Lockdown															
Arbeitspaket 1 (KeratinoSens™, U937)																							
Aufnahme, Metabolisierung					█	█	█	Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung			█	█	█										
Tox. Endgrößen*					█	█	█				█	█	█										
DNA-Schädigung								Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung			█	█	█	█	█	█							
Metabolomics																							
Arbeitspaket 2 (ex vivo Haut)																							
Vorversuche** (Methoden Homogenisierung, Nachweis DNA-Schädigung)								Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung															
Aufnahme, Metabolisierung											█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Tox. Endgrößen, DNA-Schädigung								Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung															
Metabolomics											█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Arbeitspaket 3																							
Datenanalyse								Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung															
Publikation																							
Projektabschluss								Ex vivo Haut stand wegen Pandemie nicht zur Verfügung															

Zwischenbericht 1

Zwischenbericht 2

Grüne Kästchen markieren Abweichungen des tatsächlichen Plans von dem Arbeits-/Zeitplan 09/21 ab.

Abweichungen des tatsächlichen Arbeits-/Zeitplans gegenüber dem Zwischenbericht 09/21:

- Arbeitspaket 1+2 – Metabolomics:

In einem von der Arbeitsgruppe erstellten Review über metabolomische Arbeiten mit Haut(modellen) wurde die Bedeutung der Lipide u.a. für verschiedene Prozesse beschrieben. Deswegen wurde ein Lipidomics-Verfahren mittels LC-MS etabliert. Das Ersetzen einer GC-MS und die aufwendige biostatistische Auswertung einer Vielzahl von Proben verzögerten zudem die metabolomische Auswertung, die zur Zeit noch andauert. Bisher wurden zwar die Proben der in vitro und ex vivo Versuche in der GC-MS und LC-MS gemessen, aber nur die in vitro Daten der GC-MS konnten biostatistisch/-informativ bearbeitet werden. Es ist geplant, die ex vivo und lipidomischen Daten noch auszuwerten. Ergebnisse liegen noch nicht vor.

- Arbeitspaket 2 – Aufnahme, Metabolisierung:

Wegen der pandemischen Lage waren nur begrenzte Hautproben verfügbar. Deswegen wurde kein Nachweis von B[a]P und seinen Metaboliten in der Haut durchgeführt. Das entscheidende Enzym der B[a]P Metabolisierung, CYP, wurde dosisabhängig untersucht. Da es nach B[a]P-Exposition zu einer dosisabhängigen Aktivierung der DNA-Reparatur kam, ist davon auszugehen, dass analog zum in vitro Modell auch in der ex vivo Haut B[a]P aufgenommen und zum ultimalen Kanzerogen verstoffwechselt wurde. Daher beeinträchtigen die fehlenden Untersuchungen nicht die Interpretation der ex vivo Ergebnisse.

- Arbeitspaket 2 – DNA-Schädigung:

Ursprünglich war ein Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet-Assay in der ex vivo Haut vorgesehen. In Kooperation mit der immunmodulatorischen Abteilung der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen wurde begonnen ein Verfahren zur Lyse der Haut zwecks Gewinnung der für den Assay notwendigen Einzelzellen zu etablieren, allerdings wurde wegen der begrenzten Hautproben das Verfahren nicht weiterverfolgt. Stattdessen wurde ein Verfahren zum Nachweis der Phosphorylierung eines DNA-Reparatur-Proteins H2AX etabliert. Der Nachweis von γ H2AX wird wie der Comet-Assay als Biomarker für eine genotoxische Wirkung angesehen (Kopp, Khoury, & Audebert, 2019). Zudem haben die Messungen im in vitro Modell gezeigt, dass der Nachweis der Phosphorylierung bei deutlich niedrigeren Konzentrationen auf eine DNA-Schädigung hinwies als der Nachweis von DNA-Strangbrüchen (Comet-Assay).

Wegen der begrenzten Hautproben haben sich die Messungen (auch der übrigen toxikologischen Endgrößen) verzögert.

- Arbeitspaket 3:

Wegen der oben beschriebenen Verzögerungen, verzögern sich auch die Punkte des Arbeitspakets 3.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Toxikologische Endgrößen; in vitro

Publikation:

Kersch, C., Masutin, V., Alsaleh, R., & Schmitz-Spanke, S. (2022). Synergistic effect of benzo[a]pyrene on metabolism, cellular homeostasis, and genotoxicity in two UV-irradiated skin-related cell lines (KeratiNoSens™ and U937). Scientific Report (submitted)

Kongressbeiträge:

Christian Kersch, Viktor Masutin, Simone Schmitz-Spanke (2021). Toxizität in humanen Keratinozyten nach Ko-Exposition gegen Benzo[a]pyren und UV-Strahlung. Vortrag auf der 61. wiss. Jahrestagung der DGAUM

Christian Kersch, Viktor Masutin, Rasha Alsaleh, Simone Schmitz-Spanke (2022). Synergistischer Effekt der UV-Bestrahlung auf die B[a]P-induzierte Modulation der zellulären Homöostase in zwei verschiedenen Zelllinien (KeratiNoSens™, U937). Vortrag auf der 62. wiss. Jahrestagung der DGAUM

Ergebnisse (aus der eingereichten Publikation):

Es wurden zwei Haut-relevante Zelllinien (KeratiNoSens™ [modifizierte Keratinozyten], U937 [Zelllinie mit monozytären Eigenschaften]) 24 h gegen 0,000004-40 µM B[a]P exponiert. In einer zweiten Serie wurden die Zellen zu Beginn der Exposition entweder mit 3,5 J/cm² (KeratiNoSens™; 95% UVA und 5% UVB) oder 1,7 J/cm² (U937; UVA) bestrahlt.

Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität von B[a]P, 3-OH B[a]P und B[a]P-Tetrol und der Einfluss von UV- Bestrahlung

Da eine detaillierte Analyse der B[a]P Aufnahme und Metabolisierung den Rahmen der Studie gesprengt hätte, wurde eine Alternative gewählt, bei der die Fluoreszenzintensität von B[a]P und seinen Metaboliten B[a]P-Tetrol und 3-OH B[a]P mittels Fluoreszenzspektrometrie gemessen wurde.

Die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität beider Verbindungen sprach für eine metabolische Aktivierung von B[a]P in dem Modell (Abb. 1). Die B[a]P-Tetrol-Metaboliten entstehen durch Hydrolyse des Diol-Epoxid-Vorläufers. Das BaP-7,8-Diol-9,10-Epoxid (BPDE) reagiert mit der DNA und gilt als das ultimale Kanzerogen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in beiden Zelllinien die Bedingungen für einen kanzerogenen Prozess gegeben waren.

Der Einfluss von UV- Bestrahlung auf den B[a]P-Stoffwechsel wurde ebenfalls untersucht. In der vorliegenden Versuchsanordnung hatte die UV- Bestrahlung einen leichten Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von B[a]P, beginnend nach 2 Stunden Exposition in KeratinoSens™-Zellen. Die Bildung beider Metaboliten schien nach der UV- Bestrahlung verzögert zu sein. In U937-Zellen hatte eine zusätzliche UV- Bestrahlung nur eine geringe Wirkung.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Messungen wurden die U937-Zellen einer geringeren UV- Bestrahlungsdosis und nur UVA ausgesetzt, da nur diese Form der Bestrahlung tief in die Dermis eindringt.

Durch UV- Bestrahlung verstärkte dosisabhängige CYP1A1-Aktivität nach B[a]P-Exposition

In den untersuchten Zellen hatte eine alleinige B[a]P-Exposition keine Wirkung, und nur die kombinierte Exposition mit UV- Bestrahlung erhöhte die Aktivität von CYP1A1 in beiden Zelllinien in einer deutlichen dosisabhängigen Weise, beginnend mit 0,4 µM B[a]P bis zu einem Maximum von 1600% in KeratinoSens™-Zellen und einem Maximum von 5600% in U937-Zellen (Abb. 2).

In dem Projekt wurde die bekannte phototoxische Verbindung 8-MOP als Kontrollsubstanz verwendet. Unter den Bedingungen der Einzel- und der kombinierten Exposition erreichte die Aktivität von CYP1A1 in den mit 8-MOP behandelten Zellen nicht das Niveau, das in den mit B[a]P behandelten Zellen erreicht wurde: 580 % (+UV, KeratinoSens™), 3100 % (+UV, U937).

Beeinträchtigung der Viabilität durch die kombinierte Exposition

Als Parameter der Viabilität wurden die Membranintegrität (LDH), die metabolische Aktivität (MTT) und die mitochondriale Funktion (MMP) untersucht (Abb. 3).

Eine alleinige B[a]P-Exposition führte bei beiden Zelllinien zu einer geringen Beeinträchtigung der gemessenen Parameter (Abb. 3): KeratinoSens™ - LDH bis zu 115%, MTT 122%, MMP 130%; U937 - LDH bis zu 114%, MTT 82%, MMP 128%. Diese Daten zeigen, dass die gewählten B[a]P Konzentrationen nur geringe zytotoxische Effekte induzierten, was den Bedingungen am Arbeitsplatz und in der Umwelt entspricht.

Die kombinierte Exposition mit B[a]P und UV induzierte eine ausgeprägte Zytotoxizität, wiederum in Abhängigkeit von der B[a]P-Dosis: KeratinoSens™ - LDH bis zu 214%, MTT 64%, MMP 407%; U937 - LDH bis zu 320%, MTT 113%, MMP 595%. Die Exposition mit 8-MOP ohne/mit UV- Bestrahlung führte bei allen untersuchten Parametern zu mit den höheren B[a]P-Konzentrationen vergleichbaren Antworten.

Störung des zellulären Redox-Gleichgewichts durch die kombinierte Exposition

Als Parameter des zellulären oxidativen Haushaltes wurden ROS und die Lipidoxidation analysiert (Abb. 4).

Beide Parameter zeigten minimale Veränderungen auf die alleinige B[a]P-Exposition: KeratinoSens™ - ROS bis zu 130%, Lipidperoxidation 118%; U937 - ROS 126%, Lipidperoxidation 113%. Die minimale Veränderung des oxidativen Gleichgewichts steht im Einklang mit den geringen zytotoxischen Effekten von B[a]P nach Einzelexposition.

Parallel zu den Beeinträchtigungen der Viabilität induzierte die kombinierte Exposition eine signifikante dosisabhängige Beeinträchtigung des Redox-Gleichgewichts in beiden Zelllinien, die in U937-Zellen ausgeprägter war: in KeratinoSens™ - ROS bis zu 302%, Lipidperoxidation 330%; in U937 - ROS 140%, Lipidperoxidation 1690%. 8-MOP löste ähnliche Reaktionen aus, wies aber ein geringeres Ausmaß an Lipidperoxidation auf.

Beeinträchtigung des antioxidativen Systems durch die kombinierte Exposition

Die dosisabhängigen Veränderungen des oxidativen Abwehrsystems, in Form des Glutathionsystems, NQO1 und des Keap1/Nrf2/ARE-Signalwegs, wurden untersucht, um weitere Informationen über das gestörte Redox-Gleichgewicht nach kombinierter Exposition zu erhalten.

Reduziertes Glutathion (GSH) spielt eine wesentliche Rolle im intrazellulären Redox-Gleichgewicht und ist am Entgiftungsprozess von B[a]P beteiligt. NQO1 ist ein stark induzierbares Enzym, das durch den Keap1/Nrf2/ARE-Signalweg reguliert wird. Da die KeratinoSens™-Zellen mit einem Plasmid transfiziert sind, mit dem die Induktion eines Luziferase-Gens zur Messung der Aktivierung des Keap1/Nrf2/ARE-Stoffwechselwegs quantifiziert werden kann, wurde in dieser Studie auch die Wirkung von B[a]P auf diesen Stoffwechselweg ohne/mit UV-Bestrahlung untersucht (Abb. 5).

Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zu den meisten anderen gemessenen Parametern der Keap1/Nrf2/ARE-Signalweg in KeratinoSens™-Zellen bereits durch alleinige B[a]P-Exposition dosisabhängig aktiviert wurde, was wahrscheinlich auf seine elektrophilen Metaboliten zurückzuführen ist. In beiden Zelllinien zeigten das GSH/GSSG-Verhältnis red./ox. Glutathion (GSH/GSSG) und NQO1 eine moderate Reaktion auf die alleinige B[a]P-Exposition: KeratinoSens™ - GSH/GSSG-Verhältnis 0,84, NQO1 144%, Keap1/Nrf2/ARE 208%; U937 - GSH/GSSG-Verhältnis 0,85, NQO1 98%.

Analog zur Veränderung des Redox-Gleichgewichts beeinträchtigte die kombinierte UV- und B[a]P-Exposition das antioxidative System dosisabhängig: KeratinoSens™ - GSH/GSSG-Verhältnis 0,13, NQO1 357%, Keap1/Nrf2/ARE 557%; U937 - GSH/GSSG-Verhältnis 0,24, NQO1 945%. Die Exposition gegenüber 8-MOP führte zu einer vergleichbaren Beeinträchtigung.

Verstärkung der UV-bedingten DNA-Schädigung durch B[a]P

Um das genotoxische Potential von B[a]P und UV-Bestrahlung nach alleiniger und kombinierter Exposition zu analysieren, wurden die Phosphorylierung des DNA-Reparatur Histons H2AX (γ H2AX) und die DNA-Schädigung im Comet-Assay untersucht (Abb. 6).

Alleinige UV-Bestrahlung induzierte v.a in KeratinoSens™-Zellen, die γ H2AX-Bildung: KeratinoSens™ - 324 %; U937 - 162 %. Die alleinige B[a]P-Exposition hatte bei beiden Zelllinien nahezu keinen Effekt. Im Gegensatz dazu führte eine kombinierte Exposition zu einem dosisabhängigen Anstieg der γ H2AX-Bildung in beiden Zelllinien: KeratinoSens™ - 843%; U937 - 371%.

Der Comet-Assay zeigte eine ausgeprägte DNA-Schädigung in KeratinoSens™-Zellen nach alleiniger UV-Bestrahlung: 22% geschädigte DNA in der Kontrolle im Vergleich zu 78% nach UV-Bestrahlung (KeratinoSens™). Im Gegensatz dazu zeigten die U937-Zellen eine geringere Reaktion auf die alleinige UV-Bestrahlung: 7 % im Vergleich zu 3 % in der Kontrollgruppe. Eine alleinige B[a]P-Exposition zeigte geringe genotoxische Effekte im angewandten Konzentrationsbereich: 22% in der Kontrolle im Vergleich zu 25% nach 4 μ M B[a]P (KeratinoSens™); 7% in der Kontrolle im Vergleich zu 19% (U937).

Bei KeratinoSens™-Zellen hatte die kombinierte Exposition mit B[a]P einen schwachen Effekt auf die bereits sehr hohe DNA-Schädigung durch die UV-Bestrahlung. In U937-Zellen führte die kombinierte Exposition jedoch zu einem bemerkenswerten Anstieg der Strangbrüche: 78% nach UV-Bestrahlung ohne B[a]P im Vergleich zu 82% nach UV-Bestrahlung und 4 μ M B[a]P (KeratinoSens™); 3% in der Kontrolle im Vergleich zu 75% (U937). Die 8-MOP-Exposition induzierte keine Genotoxizität.

BMD-Modellierung

Die Konzentration, die den Übergang zu einer schädlichen Wirkung markiert, ist für die Risikobewertung wichtig. Dieser Ausgangspunkt (Point of Departure, POD) kann mit einer geeigneten Methode wie dem Benchmark-Dosis-Ansatz (BMD) bestimmt werden. Diese Methode hat gegenüber dem NOAEL/LOAEL-Ansatz (No/Low-Observed-Adverse-Effect-Level) den Vorteil, dass sie unabhängig von den tatsächlich verwendeten Dosis-Wirkungs-Parametern ist. Stattdessen werden verschiedene mathematische Modelle durch die Daten gelegt und das Modell ausgewählt, das am besten die gemessenen Datenpunkte abdeckt. Eine zuvor definierte Abweichung (in der vorliegenden Studie 5 %) von der Kontrolle wird als BMD berechnet, wobei statistische Unsicherheiten durch Konfidenzintervalle (untere Konfidenzgrenze: BMDL; obere Konfidenzgrenze: BMDU) berücksichtigt werden.

In unserem in vitro Modell zeigte die Phototoxizität anhand der gemessenen Parameter meist einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und der kombinierten Exposition ab 0,4 μ M B[a]P. Die einzige Ausnahme war die Bildung von γ H2AX, die bereits ab 0,004 μ M signifikante von Kontrollbedingungen abwich. Die BMD-Modellierung der kombinierten Expositionen wurde verwendet, um die PODs der gemessenen Parameter differenzierter zu bewerten und sie zwischen den beobachteten Zelllinien zu vergleichen (Abb. 7, Tab. 2).

Die Reihung der Ergebnisse für die nicht-genotoxischen Endpunkte zeigte, dass die BMD-Werte der meisten Endpunkte bei beiden Zelllinien in einem vergleichbaren Bereich lagen (Tab. 1 und Abb. 7). Darüber hinaus wurde bei beiden Zelllinien das Glutathionsystem erst bei höheren Konzentrationen gestört (0,2 μ M B[a]P KeratinoSens™; 0,1 μ M B[a]P, U937), was darauf hindeutet, dass die Zellen eine antioxidative Abwehr für eine relativ lange Zeit aufrechterhalten konnten.

Auffallend sind die Unterschiede in den BMDs der genotoxischen und nicht genotoxischen Endpunkte. Bei beiden Zelllinien waren die Parameter der DNA-Schädigung die empfindlichsten Endpunkte. Konkret bedeutet dies, dass 0,0006 μ M (KeratinoSens™) und 0,001 μ M B[a]P (U937) DNA-Reparaturen induzierten, wobei 5% BMR eine sehr konservative Annahme ist.

In diesem Teil des Projekts wurden die Auswirkungen der einzelnen und kombinierten Expositionen in relevanten Zelllinien untersucht. Während B[a]P allein nur geringe Auswirkungen auf die gemessenen Parameter hatte, ergab die BMD-Modellierung der kombinierten UV- und B[a]P-Exposition eine schrittweise Aktivierung oder Beeinträchtigung verschiedener zellulärer Mechanismen. Die BMD-Werte für die Genotoxizität wiesen die

niedrigsten Konzentrationen auf, obwohl die antioxidative Abwehr in Form des Glutathionsystems erst bei deutlich höheren Konzentrationen beeinträchtigt wurde. Die Induktion der DNA-Reparatur (γ H2AX) war der empfindlichste Parameter. In den untersuchten Zelllinien setzten ab BMD-Werten von 0,0006 μ M B[a]P (KeratinSens™) und 0,001 μ M B[a]P (U937) eine synergistische Wirkung auf die DNA-Reparatur ein.

Toxikologische Endgrößen; ex vivo

Publikation:

Wird gerade geschrieben.

Kongressbeiträge:

„Toxizität und DNA-Reparatur in ex vivo Haut nach Ko-Exposition gegen Benzo[a]pyren und UV-Strahlung“ - eingereicht zur 63. wiss. Jahrestagung der DGAUM 2023

Ergebnisse:

Es wurde Haut von 8 Personen verwendet. Die Haut wurde direkt nach der Operation übernommen, nur die Fettschicht entfernt (full thickness) und Proben mit 0,9 mm Durchmesser ausgestanzt. Die Toxine wurden in den Dosen 0,32 – 31,8 – 318 ng/cm² B[a]P bzw. 2,16 ng/cm² 8-MOP in Aceton aufgebracht und danach verdunstet lassen. Die Exposition hat für 24 h in 12-Well Platten in 500 L Medium schwimmend stattgefunden. Die UV-Dosis betrug 7 J (95% UVA und 5% UVB). In den bestrahlten Serien wurde die Haut zu Beginn der Exposition für 2 h bestrahlt, was zu einer Pigmentierung der Haut führte.

Analog zu den in vitro Versuchen wurden die Zellviabilität, Enzymaktivitäten, der oxidative Haushalt und die DNA-Reparatur untersucht. Aufnahme/Metabolisierung, MMP, ROS und Comet Assay wurden nicht durchgeführt, was teilweise an der geringeren Anzahl der Hautproben und teilweise an technischen Problemen lag, die in der Laufzeit des Projektes nicht gelöst werden konnten. Die Assays MTT und γ H2AX wurden mit 2 biologischen, die übrigen Assays mit 3 Replikaten durchgeführt. Von allen biologischen Replikaten wurden 4 technische durchgeführt.

Nur die kombinierte Exposition steigert die CYP-Aktivität

Die alleinige UV-Bestrahlung und alleinige B[a]P-Exposition steigerten leicht die CYP-Aktivität (UV auf 112%, B[a]P auf max. 109%). Die kombinierte Exposition steigerte signifikant dosisabhängig die Aktivität auf max. 140%. 8-MOP hat auch in Kombination mit UV einen geringen steigernden Effekt auf max. 110%.

Geringe Beeinträchtigung der Viabilität durch die kombinierte Exposition

Die alleinige UV-Bestrahlung reduzierte den LDH-Gehalt auf 85%. Sowohl die alleinige B[a]P-Exposition als auch die mit UV-Bestrahlung kombinierte Exposition zeigten keine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die alleinige B[a]P-Exposition führte teilweise zu einer verminderten, teilweise zu einer erhöhten LDH-Freisetzung; die kombinierte Exposition durchweg zu einer verminderten Freisetzung. 8-MOP erhöhte in alleiniger Exposition LDH und reduzierte es in Kombination mit UV.

Die metabolische Aktivität gemessen anhand der MTT-Bildung verschlechterte sich nach alleiniger UV-Bestrahlung signifikant auf 73%. Alleinige B[a]P-Exposition verschlechterte ebenfalls die Aktivität um maximal 28%. Die kombinierte Exposition führte zunächst zu einer deutlichen Reduktion um 31% nach 31,8 mg/cm². Auch bei höheren B[a]P-Konzentrationen in Kombination mit UV blieb die metabolische Aktivität beeinträchtigt, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. 8-MOP alleine hat einen minimalen Effekt, die Kombination mit UV führte zu einer leichten Reduktion um 14%.

Die kombinierte Exposition verbessert teilweise das Verhältnis red./ox. Glutathion und erhöht die NQO1-Aktivität

Die Folgen einer möglichen oxidativen Schädigung wurden anhand der Lipidperoxidation untersucht. Weder die alleinigen noch die kombinierten Expositionen zeigten signifikante Änderungen gegenüber unbestrahlter Haut.

Mögliche Veränderungen in der oxidativen Abwehr wurden anhand des Verhältnisses red./ox. Glutathion untersucht. Da NQO1 u.a. auch eine Rolle in der oxidativen Abwehr spielt, wurde dieses Enzym ebenfalls analysiert.

Alleinige UV-Bestrahlung erhöhte signifikant den Anteil oxidierten Glutathions, so dass der Quotient auf 140 % stieg. Die alleinige B[a]P-Exposition hatte keine Effekte. Die kombinierte B[a]P- und UV-Exposition vergrößerte nach der geringsten B[a]P-Konzentration signifikant den Quotienten auf 156%, nach höheren B[a]P-Konzentrationen viel der Quotient auf Ausgangsniveau. 8-MOP hatte nach alleiniger Exposition einen sehr geringen Effekt, in Kombination mit UV stieg der Quotient auf 156%.

Alleinige UV-Bestrahlung hatte keinen Effekt auf die NQO1-Aktivität. Alleinige B[a]P-Exposition steigerte tendenziell die Aktivität dosisabhängig. Die kombinierte Exposition steigerte signifikant und dosisabhängig die Aktivität bis zu einer B[a]P-Konzentration von 31,8 ng/cm² auf 130%, bei der höchsten Konzentration kam es zu einem geringen Abfall. 8-MOP steigerte sowohl alleine als auch in Kombination die Aktivität. Die Kombination erzielte eine signifikante Steigerung auf 118%.

Die kombinierte Exposition reduziert die DNA-Reparatur gegenüber der alleinigen B[a]P-/8-MOP Exposition

Als Marker für mögliche DNA-Schäden wurde die Phosphorylierung des DNA-Reparatur Histons H2AX (γ H2AX) analysiert.

Die alleinige UV-Bestrahlung reduzierte die Fluoreszenz zum Nachweis von γ H2AX. Die alleinige B[a]P-Exposition steigert signifikant und dosisabhängig die Phosphorylierung. Hier konnte eine BMD-Modellierung durchgeführt werden. Der Wert für das Einsetzen einer abweichenden Wirkung lag bei ca. 1,3 ng/cm² B[a]P.

Die kombinierte Exposition begann wegen des UV-Effekts auf einem signifikant niedrigeren Niveau, die Phosphorylierung stieg im Konzentrationsbereich signifikant und dosisabhängig ohne das Niveau der alleinigen B[a]P-Exposition zu erreichen. Die alleinige 8-MOP-Exposition erhöhte signifikant die Phosphorylierung, während die kombinierte Exposition sie signifikant reduzierte.

Vergleicht man die Ergebnisse der ex vivo Haut mit den Ergebnissen der Untersuchungen an den Zelllinien, traten teilweise erhebliche Unterschiede auf.

Die CYP Aktivität wurde wie in den Zelllinien signifikant stärker durch die kombinierte Exposition angeregt. Damit ist die Voraussetzung für eine erhöhte Metabolisierung von B[a]P zum ultimalen Kanzerogen, dem Diol-Epoxid, durch die Kombination gegeben. Die Ergebnisse bzgl. der Zytotoxizität waren widersprüchlich. In den Zelllinien schädigte die kombinierte Exposition dosisabhängig die Viabilität in allen gemessenen Parametern. In der ex vivo Haut ist kein synergistischer Effekt erkennbar. Die LDH-Freisetzung wurde durch die Kombination vermindert, d.h. es kam zur geringeren Membranschädigung, während die metabolische Aktivität nach allen Expositionen tendenziell eingeschränkt war.

Im Gegensatz zu den Zelllinien, zeigte die ex vivo Haut keinen Effekt auf die Lipidperoxidation nach allen Expositionen. Interessanterweise und im Gegensatz zu den Zelllinien, verbesserte die alleinige UV-Bestrahlung in der ex vivo Haut das Glutathionsystem, was nach der kombinierten Exposition mit der geringsten B[a]P-Konzentration erhalten blieb. Die weiteren kombinierten Expositionen zeigten keinen Effekt gegenüber der

unbehandelten/unbestrahlten Haut. Die Aktivität von NQO1 wurde durch die kombinierte Exposition leicht gesteigert. Damit scheint das antioxidative System teilweise durch UV-Bestrahlung verbessert zu werden. Die Kombination führte im Gegensatz zu den Versuchen an den Zelllinien zu keinem synergistischen Effekt.

In den Zelllinien erhöhte die kombinierte Exposition signifikant γ H2AX, was auf eine Aktivierung der DNA-Reparatur hinweist. In ex vivo Haut reduzierte die UV-Bestrahlung die Phosphorylierung während B[a]P sie erhöhte. Die kombinierte Exposition überstieg erst bei höheren B[a]P-Konzentrationen den Phosphorylierungsgrad der unbehandelten/unbestrahlten Zellen. Damit induzierte die kombinierte Exposition in unserem Modell weniger DNA-Reparatur als die B[a]P-Exposition. Zu beachten ist, dass in unserem Modell die Reparatur-Foci erst nach 24 h untersucht wurden. Es ist denkbar, dass kurz nach der Bestrahlung eine höhere Phosphorylierung stattfand, diese aber innerhalb der 24 h absank.

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt wäre die protektive Wirkung von Melatonin gegen UV-Schäden. Wie beschrieben, zeigten die Hautproben nach der Bestrahlung eine Pigmentierung. Von Melatonin ist bekannt, dass es u.a. die Glutathion-S-transferase induziert, was der Grund für die Erhöhung des GSH/GSSG Quotienten sein könnte nach UV-Bestrahlung.

Insgesamt ergänzen die Ergebnisse der ex vivo Versuche die Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche und zeigen eindrucksvoll die Unterschiede zwischen Zelllinien und ex vivo Haut

Metabolomics; in vitro

Publikation:

Masutin, V., Kersch, C., & Schmitz-Spanke, S. (2022). A systematic review: metabolomics-based identification of altered metabolites and pathways in the skin caused by internal and external factors. *Exp Dermatol*, 31(5), 700-714. doi:10.1111/exd.14529

Eine zweite Publikation zu den Ergebnissen der Untersuchungen an den Zelllinien wird gerade geschrieben.

Kongressbeiträge:

Viktor Masutin, Christian Kersch, Simone Schmitz-Spanke (2021). Review zu metabolomischen Änderungen der Haut durch innere und äußere Einflussfaktoren. Posterbeitrag auf der 61. wiss. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (DGAUM) → 2. Platz im Nachwuchssymposium der DGAUM

„Metabolomische Studien in KeratinoSens™ Zellen nach Exposition gegen Benzo[a]pyren alleine und in Kombination mit UV-Bestrahlung“, eingereicht zur 63. wiss Jahrestagung der DGAUM 2023

“Toxicity and DNA-repair in in vitro and ex vivo skin models after single and combined exposure to benzo[a]pyrene and UV irradiation“, eingereicht zum 8th German Pharm-Tox Summit im Rahmen der 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2023

Ergebnisse:

Review

Eine Literaturrecherche ab 2013 (wegen der technischen, biostatistischen Entwicklung auf diesem Gebiet wurde der Zeitraum eingegrenzt) mit den Suchbegriffen „metabolomics human skin“ und „metabolom*“ AND „skin“ identifizierte 2397 Publikationen. Nach Selektion (u.a. nur Originalarbeiten, nur Arbeiten in menschlicher Haut/Hautzellen) wurden 22 Arbeiten ausgewählt, die Veränderungen der zellulären Stoffwechselprodukte nach Exposition gegen Strahlung (n=5), Gefahrstoffe (n=7), Gefahrstoffe+Strahlung (n=1) sowie durch Alterung (n=2) und Hauterkrankungen (hauptsächlich Psoriasis; n=7) untersuchten. Insgesamt wurden aus diesen Studien 364 Metabolite identifiziert, deren Konzentration durch die oben genannten Einwirkungen gegenüber Kontrollbedingungen erheblich verändert wurde. Mithilfe von Stoffwechseldatenbanken und Signalweganalysen (Human Metabolome Database (HMDB), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), MetaboAnalyst) wurden die einzelnen Metabolite den entsprechenden Stoffwechselwegen zugeordnet und die am stärksten regulierten Signalwege identifiziert. Alle Einwirkungsfaktoren lösten oxidativen Stress aus. So wurden die oxidativen Abwehrsysteme, insbesondere Coenzym Q10 (Alterung) und das Glutathionsystem (Bestrahlung, Alterung, Xenobiotika) beeinträchtigt. Auch der Lipidstoffwechsel wurde durch alle untersuchten Faktoren beeinflusst. Das Carnitin-Shuttle, als Teil der β -Oxidation, wurde durch alle Einwirkungsfaktoren außer der Alterung aktiviert. Die Glykolyse, der Krebs-Henseleit-Zyklus und der Purinstoffwechsel wurden hauptsächlich durch Strahlung und Gefahrstoffe beeinflusst. Als Reaktion auf oxidativen Stress wurde der Pentosephosphatweg und der Krebs-Henseleit-Zyklus herunterreguliert. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass vor allem der Energiestoffwechsel, der Lipidstoffwechsel, die oxidative Abwehr und die DNA-Reparatur durch die untersuchten Faktoren beeinflusst wurden (Abb. 12). Die Arbeit wurde bereits publiziert (Masutin, Kersch, & Schmitz-Spanke, 2022).

In vitro

In den in vitro Modellen wurde der Einfluss von 0,004 μM und 4 μM B[a]P in jeweils 3 biologischen Replikaten in einem *untargeted* Ansatz mittels GC-MS untersucht. In allen Modellen wurde die Antwort auf B[a]P-Exposition mit/ohne UV-Bestrahlung und auf alleinige UV-Bestrahlung untersucht.

Die kombinierte Exposition führt zu einer erhöhten Regulation bei niedrigeren B[a]P-Konzentrationen in KeratinoSensTM-Zellen

In KeratinoSensTM-Zellen wurden nach alleiniger Exposition gegen B[a]P die meisten Metabolite nach 4 μM reguliert (70 Metabolite). Die Kombination mit UV-Bestrahlung verschob die maximale Regulation zur geringeren B[a]P Konzentration (0,004 μM B[a]P: 74 Metabolite). In U937-Zellen wurden ohne UV-Bestrahlung ebenfalls nach Exposition gegen 4 μM B[a]P die meisten Metabolite reguliert (43). Die gleichzeitige UV-Bestrahlung führte diesmal zu keiner Verschiebung, wieder wurden bei 4 μM B[a]P die meisten Regulationen beobachtet (6 Metabolite). Allerdings müssen diese Zahlen vorsichtig interpretiert werden, da durch die synergistische Wirkung der kombinierten B[a]P und UV-Behandlung die Toxizität stieg und weniger Zellen geerntet werden konnten. Deshalb wird nachfolgend besonders auf die Regulationen infolge der Exposition gegen 0,004 μM B[a]P ohne/mit UV in KeratinoSensTM-Zellen eingegangen.

Jede Exposition führt zu einer Gruppe von regulierten Metaboliten, die charakteristisch für die Exposition ist

Die multivariate statistische Analyse der Daten mittels Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) zeigte eine deutliche Clustertrennung zwischen den unterschiedlichen Expositionsgruppen in allen Modellen, was darauf hindeutet, dass die Veränderungen bei den Metaboliten für jede Gruppe charakteristisch sind (Abb. 14).

Metabolite aus dem Energiestoffwechsel, antioxidativen Stoffwechselwegen oder DNA-Reparatursystemen sind wichtig für die Clustertrennung

Je höher die VIP (Variablenbedeutung in der Projektion)-Werte der Metaboliten sind, desto wichtiger ist ihr Beitrag zu den Unterschieden zwischen den Gruppen wie sie in Abb. 14 dargestellt wurden. Ein aus den PLS-DA-Modellen generiertes VIP-Diagramm ordnete jeden Metaboliten nach seiner Fähigkeit ein, exponierte Bedingungen von nicht exponierten Kontrollen zu unterscheiden. Metaboliten, die den VIP-Wert von 1,5 überschreiten, werden im PLS-DA-Modell als wichtig angesehen. Abbildung 15 zeigt exemplarische alle Metabolite, die den VIP-Wert von 1,5 in KeratinoSensTM-Zellen überschritten. Viele der regulierten Metaboliten stammen aus dem Energiestoffwechsel, antioxidativen Stoffwechselwegen oder DNA-Reparatursystemen.

Wie oben beschrieben, standen wegen der verstärkten Toxizität nach kombinierter B[a]P und UV-Behandlung weniger Zellen für Analysen zur Verfügung. Den besten Vergleich der alleinigen B[a]P- gegen die mit UV kombinierte Exposition bieten die Expositionen mit 0,004 μM B[a]P. Zu den Metaboliten, die die bestrahlten und exponierten Zellen am stärksten von den Kontrollzellen diskriminierten, gehörten u.a. Glutathion, Adenosinmonophosphat und L-Aspartat. Glutathion ist die wichtigste oxidative Abwehr, Adenosinmonophosphat und L-Aspartat sind, neben anderen Funktionen, in der DNA-Synthese involviert (Fu & Danial, 2018).

Glutathion- und Purin-Metabolismus werden durch Exposition reguliert

Eine weitere Möglichkeit, für die Diskriminierung wichtige Stoffwechselwege/Metabolite zu identifizieren, ist die Signalweganalyse (Abb. 16). In dieser Analyse wird untersucht, ob eine Gruppe funktionell verwandter Metabolite signifikant angereichert ist. Signalwege, die u.a. einen p-Wert < 0,05 haben, gelten als signifikant reguliert. Die Ergebnisse der Analyse der Stoffwechselwege zeigten, dass nur vier Stoffwechselwege signifikant ($p < 0,05$) durch eine niedrige B[a]P-Dosis und 22 durch eine niedrige B[a]P+UV-Dosis reguliert wurden. (Abb. 16). Unter Berücksichtigung der Häufigkeit, des p-Wertes, der Auswirkung und der Anzahl der Treffer pro Stoffwechselweg können die folgenden Stoffwechselwege besonders hervorgehoben werden: Glutathion-, Arginin- und Purin-Metabolismus. Von diesen zeigt der Glutathion-Stoffwechsel bzgl. des Impact-Faktors die größte Beeinflussung.

Eine niedrige B[a]P-Konzentration induzierte einen Anstieg der Glutathion-Konzentration, was auf ein Hochfahren des antioxidativen Systems hindeutet, um dem erhöhten intrazellulären Oxidationsniveau entgegenzuwirken. Eine niedrige B[a]P-Dosis-Exposition mit zusätzlicher UV-Bestrahlung (4 nM+UV) erschöpfte die Glutathion-Speicher und ihre Vorstufen (Glutaminsäure, Glycin, L-Cystein-Glycin und L-Ornithin) und führte letztlich zu irreversiblen Zellschäden, die sich in einer verringerten Lebensfähigkeit der Zellen widerspiegeln, ähnliches wurde nach der Exposition gegen die höhere B[a]P Konzentration beobachtet (Abb. 17).

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Folgende Publikationen sind seit Projektbeginn erschienen:

Marrot, L. (2018). "Pollution and Sun Exposure: A Deleterious Synergy. Mechanisms and Opportunities for Skin Protection." Curr Med Chem 25(40): 5469-5486.

In dieser Literaturrecherche wird beschrieben, dass oxidativer Stress, Inflammation und eine verschlechterte Stoffwechsellage adverse Effekte in der Haut von Umweltverschmutzung sind. Sie verweisen auf eigene Studien zur Wirkung einer Ko-Exposition von PAHs und UV-Bestrahlung auf Keratinozyten. Diese Studien wurden im Antrag diskutiert. Die Literaturrecherche weist u.a. auf einen protektiven Effekt von Nrf2 hin. Wie im Abschlussbericht beschrieben, wurde dieser Faktor auch von uns in den KeratinoSens™-Zellen überprüft. Bereits die Exposition gegen B[a]P induzierte diesen Signalweg. Die kombinierte Exposition führte zu einer über-additiven Induktion bei 0,4 µM und 4 µM B[a]P.

Pollet, M., S. Shaik, M. Mescher, K. Frauenstein, J. Tigges, S. A. Braun, K. Sondenheimer, M. Kaveh, A. Bruhs, S. Meller, B. Homey, A. Schwarz, C. Esser, T. Douki, C. F. A. Vogel, J. Krutmann and T. Haarmann-Stemann (2018). "The AHR represses nucleotide excision repair and apoptosis and contributes to UV-induced skin carcinogenesis." Cell Death Differ 25(10): 1823-1836.

In dieser mechanistischen Studie wurde die Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) in der DNA-Reparatur nach UV-Schädigung untersucht. An diesem Rezeptor binden die PAHs, weswegen diese Studie für das Projekt interessant ist. Nach dieser Studie verstärkt eine AhR-Aktivierung über verschiedene Mechanismen die Photo-toxizität nach UVB-Bestrahlung in einer bestimmten Mausrasse. Direkte Konsequenzen für unsere Studie können daraus nicht abgeleitet werden.

Bourgart, E., D. Barbeau, M. Marques, A. von Koschembahr, D. Beal, R. Persoons, M. T. Leccia, T. Douki and A. Maitre (2019). "A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure." Arch Toxicol 93(1): 81-93.

In dieser analytischen Studie wurden Absorption/Penetration und Metabolisierung von B[a]P an einem ex vivo Modell dosis- und zeitabhängig untersucht. Die Gruppe verwendete eine aufwendige Analytik, die wir nicht zur Verfügung haben. Zur Detektion von B[a]P und einiger Metabolite im Fluoreszenzspektrometer wurden die Einstellungen aus dieser Arbeit übernommen. Die ex vivo Haut wurde ebenfalls mit in Aceton gelöstem B[a]P exponiert.

Bourgart, E., R. Persoons, M. Marques, A. Rivier, F. Balducci, A. von Koschembahr, D. Beal, M. T. Leccia, T. Douki and A. Maitre (2019). "Influence of exposure dose, complex mixture, and ultraviolet radiation on skin absorption and bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbons ex vivo." Arch Toxicol 93(8): 2165-2184.

Die Arbeitsgruppe verwendete ihr in der vorhergehenden Arbeit etabliertes Modell und die Analytik, um Absorption/Penetration und Metabolisierung von PAH-Mischungen bzw. B[a]P nach UV-Bestrahlung zu untersuchen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass UV-Bestrahlung die Metabolisierung von Mischungen und B[a]P inhibiert. Allerdings akkumulierte B[a]P in der Haut stärker nach UV-Bestrahlung. In unseren ex vivo Versuchen haben wir keine Aufnahme und Metabolisierungsversuche durchgeführt. Ein Vergleich zwischen den Studien ist aufgrund der unterschiedlichen Designs und v.a. der Bestrahlung problematisch. Wir beobachteten aber in unserer ex vivo Haut, bei der es sich im Gegensatz zu der Studie von Bourgart um ein full thickness-Präparat handelt, eine signifikant gesteigerte CYP-Aktivität nach kombinierter Exposition. Dieses Enzym ist für die Metabolisierung von B[a]P zuständig. In den in vitro Versuchen ging dies allerdings nicht mit einer vermehrten Bildung von Metaboliten einher. Hier wären entsprechende Untersuchungen in der ex vivo Haut sehr spannend.

von Koschembahr, A., Youssef, A., Beal, D., Calissi, C., Bourgart, E., Marques, M. & Douki, T. (2018). "Solar simulated light exposure alters metabolization and genotoxicity induced by benzo[a]pyrene in human skin". Sci Rep, 8(1), 14692.

Die gleiche Gruppe untersuchte in dieser Studie an ex vivo Haut und primären Keratinozyten die Genexpression von verschiedenen CYPs und die DNA-Adduktbildung nach alleiniger B[a]P-Exposition und in Kombination mit UV-Bestrahlung. In beiden Modellen induzierte die alleinige B[a]P-Exposition die Genexpression und führte zur Adduktbildung, während die kombinierte Exposition beides reduzierte. In unseren Modellen beobachteten wir eine Zunahme der CYP-Aktivität besonders nach der kombinierten Exposition. In den Zelllinien führte die kombinierte Exposition zu einem starken Anstieg von γ H2AX, was evtl. auf eine vermehrte Adduktbildung hinweisen könnte. In der ex vivo Haut war die Antwort differenzierter. Hier könnte die UV-Bestrahlung einen protektiven Effekt hinsichtlich DNA-Schädigung haben.

von Koschembahr, A., A. Youssef, D. Beal, E. Bourgart, A. Rivier, M. Marques, M. T. Leccia, J. P. Giot, A. Maitre and T. Douki (2020). "Metabolism and genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human skin explants: mixture effects and modulation by sunlight." Arch Toxicol 94(2): 495-507.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte in einer weiteren Studie im gleichen Modell u.a. den Einfluss von PAH-Mischungen und UV-Bestrahlung auf die Bildung von DNA-Addukten und die Expression verschiedener CYP450 Gene in ex vivo Haut. Sie beobachteten eine zunehmende Inhibierung der CYP450 Expression und Adduktbildung je komplexer die PAH-Mischung war. In allen Arbeiten exponierte die Gruppe nur gegen 1-2 B[a]P-Konzentrationen. Dadurch sind keine Informationen bzgl. des Beginns einer adversen Antwort verfügbar.

von Koschembahr, A., A. Youssef, D. Beal, L. Gudimard, J. P. Giot and T. Douki (2020). "Toxicity and DNA repair in normal human keratinocytes co-exposed to benzo[a]pyrene and sunlight." Toxicol In Vitro 63

In der aktuellsten Arbeit dieser Arbeitsgruppe variierten sie den Zeitpunkt der UV-Bestrahlung während der Exposition gegen zwei B[a]P-Konzentrationen in primären Keratinozyten. Sie untersuchten u.a. die Rolle von AhR und die Bildung eines oxidativen Markers in Keratinozyten. Erfolgte die UV-Bestrahlung nach der Exposition gegen B[a]P war der Schaden größer. AhR spielte in diesem Modell keine Rolle. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass der oxidative Stress infolge der UV-Bestrahlung die DNA-Reparatur störte. Wir exponierten die Zellen gegen einen weiten B[a]P-Bereich, um Benchmark-Berechnungen für die einzelnen Endgrößen durchführen zu können. Dadurch konnten wir die B[a]P Konzentration quantifizieren, der in unserem Modell zu adversen Effekten führte.

Sun, K., Song, Y., He, F., Jing, M., Tang, J., & Liu, R. (2021). "A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics." Sci Total Environ, 773

In dieser Übersichtsarbeit werden verschiedene Aspekte der adversen Wirkung von PAK auf den Menschen dargestellt, u.a. in Bezug auf Mikroplastik. Für uns relevant sind die Ausführungen zur Phototoxizität, in denen aber keine neuen Aspekte oder neue Studien beschrieben werden.

Malkova, A., Borska, L., Smejkalova, J., Hamakova, K., Kremlacek, J., Svadlakova, T. & Fiala, Z. (2021). „Genotoxic effect of simultaneous therapeutic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation." J Appl Toxicol, 41(6), 907-914.

In dieser Arbeit wurden die therapeutische Effektivität und der genotoxische Schaden der Goeckerman-Therapie untersucht, bei der Psoriasis-Erkrankte mit einer Kombination aus Rohkohlenteeer und UV-Strahlung behandelt werden. Ein möglicher genotoxischer Schaden durch die Therapie wurden anhand von Chromosomenaberrationen in peripheren Lymphozyten untersucht. Die meisten und signifikanten erhöhten Aberrationen gegenüber der Ausgangssituation vor der Behandlung wurden bei einer Kombination von 4% Rohrteeer + UVB-Bestrahlung gefunden. Allerdings zeigte die Gruppe mit der höchsten Teeer-Exposition (5% +UVA/UVB) keine vermehrten Schäden gegenüber der 4%-UVB-Gruppe. Leider wurden in dieser Arbeit keine Hautzellen untersucht. Unsere eigene Literaturrecherche aus dem zweiten Teilprojekt des aktuellen Projekts ergab kein erhöhtes Hautkrebsrisiko für Patienten, die nach diesem Schema behandelt wurden.

Yang, X., Wang, J., Wang, H., Li, X., He, C., & Liu, L. (2021). „Metabolomics study of fibroblasts damaged by UVB and BaP." Sci Rep, 11(1)

In dieser Arbeit wurden Fibroblasten gegen B[a]P (5 Konz. zwischen 10 nM – 100 µM, 24 h) und UVB exponiert. Es wurde die Viabilität und die ROS-Produktion überprüft. Die gegen 10 µM B[a]P mit/ohne UV exponierten Zellen wurden metabolisch mittels UHPLC-QTOF-MS analysiert. Die LC-MS Analyse identifiziert im Gegensatz zur GC-MS vermehrt Lipide. In den für die metabolischen Studie ausgewählten Zellen, war ROS signifikant erhöht. 24 Metabolite waren in der UVB-Gruppe verändert, 25 in der B[a]P- und 33 in der kombinierten Expositionsgruppe. Betroffen waren Metabolite wie Glycerophosphocholin, Lactosylceramid, Guanidinbernsteinsäure, Glutathion und Lysophosphatidylcholin. Als Signalwege wurden der Glycerophospholipid- und Glutathion-Stoffwechsel reguliert. In unserem Projekt haben wir ebenfalls die Lipide mittels LC-MS analysiert. Allerdings konnten wir die Daten bisher nicht weiterverarbeiten, die Auswertung ist geplant. Spannend wird ein Vergleich sein. Wie in unseren metabolischen Untersuchungen wurde das Glutathionsystem reguliert.

Nach unseren Recherchen sind keine weiteren relevante Publikationen erschienen

...

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Toxikologische Endgrößen; in vitro – ex vivo

Die Versuche an den Zelllinien und der ex vivo Haut demonstrieren eindrucksvoll die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Modell. Auch wenn die Expositionsverhältnisse nicht direkt vergleichbar sind, wurde versucht, durch die Studiendesigns ein ähnliches Maß an Zytotoxizität in beiden Modellen zu erreichen. Wir waren selber von der Diskrepanz der Ergebnisse überrascht. Der Grund liegt wahrscheinlich in der erhöhten Komplexität der ex vivo Haut. In den Zelllinien führte die kombinierte Exposition zu einem teilweisen synergistischen Effekt. In der ex vivo Haut wurden keine derartigen Effekte beobachtet.

Von beiden Zelllinien wurde B[a]P aufgenommen und metabolisiert. In der ex vivo Haut wurden nicht direkt B[a]P und die Metabolite fluoreszenzspektrometrisch nachgewiesen. Die erhöhte CYP-Aktivität und die vermehrte Phosphorylierung von H2AX in der ex vivo Haut weisen auf eine Aufnahme und Metabolisierung hin.

In beiden Modellen wurde der oxidative Haushalt belastet, allerdings mit deutlich unterschiedlichen Konsequenzen. In den Zelllinien stiegen der ROS-Gehalt und das Maß der Lipidperoxidation durch die kombinierte Exposition in einem über-additiven Umfang. Die BMD-Werte liegen hier bei ca. 0,05 μM B[a]P (KeratoSens™) bzw. 0,02 μM B[a]P (U937) für die Lipidperoxidation nach kombinierter Exposition. Das Glutathionsystem, als stärkstes Element der oxidativen Abwehr, wurde bei höheren Konzentrationen über-additiv beeinträchtigt. Die ex vivo Haut zeigte dagegen nach keiner Exposition eine erhöhte Lipidperoxidation und das Glutathionsystem blieb nach den kombinierten Expositionen unbeeinträchtigt. Alleinige UV-Bestrahlung schien das System zu stärken.

Bzgl. der im Hinblick auf Kanzerogenität wichtigen DNA-Schädigung reagierten die Zellen der beiden Zelllinien bereits auf die alleinige UV-Bestrahlung mit deutlichen DNA-Strangbrüchen und einer vermehrten Phosphorylierung von H2AX. B[a]P alleine hatte keine Auswirkung auf die DNA und die kombinierte Exposition B[a]P+UV führte nur zu einer geringen, wenn auch teilweise signifikanten Steigerung. Der empfindlichste Parameter war γH2AX mit einem BMD von 0,0006 μM (KeratoSens™) bzw. 0,001 μM (U937) der kombinierten Exposition gegenüber Kontrolle. Die ex vivo Haut reagierte hinsichtlich γH2AX deutlich anders. Die alleinige UV-Bestrahlung erniedrigte γH2AX , während B[a]P es erhöhte. Die kombinierte Exposition überstieg erst bei höheren B[a]P-Konzentrationen den Wert un behandelter Haut; d.h. die UV-Bestrahlung schien in diesem Modell eine protektive Wirkung zu haben. Damit würde die vorliegende Studie mit dem gewählten Studiendesign das Ergebnis der Literaturrecherche des anderen Teilprojektes unterstreichen, in dem keine Hinweise in epidemiologischen Studien und widersprüchliche in Tierversuchen zur synkanzerogenen Wirkung gefunden wurden. Interessanterweise beschrieben auch einige Tierversuche eine protektive UV-Wirkung in diesem Kontext.

Um die durch die ex vivo Versuche und die Literaturrecherche geformte Hypothese der fehlenden Synkanzerogenese mechanistisch zu untersuchen, wären weitere ex vivo Versuche sinnvoll. In diesen Versuchen könnte die UV-Bestrahlung und die Expositionsdauer variiert bzw. verlängert werden. Außerdem könnten weitere Parameter beispielsweise der Aufnahme, der DNA-Schädigung, des Glutathion-, Melanin- oder Melantoninsystems dosis- und zeitabhängig untersucht werden. Sollten adverse Effekte auftreten, könnte über eine BMD Berechnung die B[a]P-/UV-Konzentration berechnet mit realen Bedingungen verglichen werden.

Metabolomics; in vitro

Bisher konnten nur die metabolomischen Daten der in vitro Untersuchungen mittels GC-MS ansatzweise verarbeitet werden. Die lipidomischen Daten, die Aufschlüsse über immunologische bzw. inflammatorische Signalwege geben

könnten, so wie die Daten der ex vivo Untersuchungen konnten noch nicht weiterverarbeitet werden (siehe auch Kapt. 7).

Die bisherigen Daten unterstützen die Ergebnisse der Analysen der verschiedenen toxikologischen Endgrößen. Das Glutathionsystem und die DNA-Reparatur wurde durch die kombinierte Exposition vermehrt reguliert. Interessant wäre hier der Vergleich mit den ex vivo Daten. Aber auch hier sind zusätzliche Untersuchungen, wie z.B. das Überprüfen von Aktivitäten beteiligter Enzyme, notwendig.

...

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Ergebnisse sollen in weiteren Publikationen dargestellt werden:

- Toxikologische Endgrößen; ex vivo
Diese Arbeit wird derzeit geschrieben.
- Metabolomics; in vitro
Diese Arbeit wird ebenfalls gerade geschrieben
- Metabolomics; ex vivo sowie Lipidomics (in vitro, ex vivo)
Diese Daten müssen noch ausgewertet werden. Leider konnte Herr Masutin, der die metabolomischen Untersuchungen des Projekts betreut hat, nicht weiter im Institut beschäftigt werden, so dass sich die Arbeiten verzögern werden.

Außerdem sollen Teile der Ergebnisse bei der wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt werden.

8. Anhang/Anhänge

entfällt

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Entfällt

9. Literatur

- Fu, A., & Danial, N. N. (2018). Grasping for aspartate in tumour metabolism. *Nat Cell Biol*, *20*(7), 738-739. doi:10.1038/s41556-018-0137-9
- Kopp, B., Khoury, L., & Audebert, M. (2019). Validation of the gammaH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Archives of Toxicology*, *93*(8), 2103-2114. doi:10.1007/s00204-019-02511-9
- Masutin, V., Kersch, C., & Schmitz-Spanke, S. (2022). A systematic review: metabolomics-based identification of altered metabolites and pathways in the skin caused by internal and external factors. *Exp Dermatol*, *31*(5), 700-714. doi:10.1111/exd.14529
- Zinkeviciene, A., Kainov, D., Girkontaite, I., Lastauskiene, E., Kvedariene, V., Fu, Y., . . . Velagapudi, V. (2016). Activation of Tryptophan and Phenylalanine Catabolism in the Remission Phase of Allergic Contact Dermatitis: A Pilot Study. *Int Arch Allergy Immunol*, *170*(4), 262-268. doi:10.1159/000450789

10. Legenden, Abbildungen und Tabellen

Figure 1: Temporal progression of the fluorescence of B[a]P, 3-OH B[a]P, and B[a]P-tetrol in the absence (-) and presence (+) of UV irradiation in (A) KeratinoSens™ and (B) U937 cells. Cells were exposed to 40 µM B[a]P and fluorescence was monitored using a multimode microplate reader

Figure 2: Relative change of the dose-dependent activity of CYP1A1 in both cell lines. Cells were exposed for 24 h either to B[a]P/8-MOP alone or with simultaneous UV irradiation at the start of exposure. Results represent the mean ± SD. Statistical significance denotes a comparison to the same condition without UV irradiation (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Fig. 3: Relative change of viability in terms of (A) LDH activity and (B) the amount of formazan (MTT). (C) MMP assesses the impact on mitochondrial function. Cells from both cell lines were exposed for 24 h either to B[a]P/8 MOP alone or with simultaneous UV irradiation at the start of exposure. Results represent the mean ± SD. Statistical significance denotes a comparison to the same condition without UV irradiation (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Figure 4: Relative change of the dose-dependent modulation of the cellular redox balance in both cell lines by determination of (A) ROS and (B) lipid peroxidation. Cells were exposed for 24 h either to B[a]P/8-MOP alone or with simultaneous UV irradiation at the start of exposure. Results represent the mean ± SD. Statistical significance denotes a comparison to the same condition without UV irradiation (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Figure 5: Relative change in the dose-dependent status of protective antioxidants: (A) GSH/GSSG ratio, (B) NQO1. (C) The activation of the Keap1/Nrf2/ARE pathway was only assessed in KeratinoSens™. Cells were exposed for 24 h either to B[a]P/8-MOP alone or with simultaneous UV irradiation at the start of exposure. Results represent the mean ± SD. Statistical significance denotes a comparison to the same condition without UV irradiation (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Figure 6: (A) The percentage of γH2AX-positive cells as compared to control in both cell lines. (B) Comet-assay results showing DNA damage as a percentage of DNA in tail in both cell lines. Cells for comet assay were exposed for 2 h either to B[a]P/8-MOP alone or with simultaneous UV irradiation at the start of exposure. Results represent the mean ± SD. Statistical significance denotes a comparison to the same condition without UV irradiation (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Figure 7: Comparison of the confidence intervals in terms of BMDLs, BMDs, and BMDUs for both cell lines and all endpoints/assays for which mathematical models could be fitted. The combined exposure conditions compared to UV-irradiated cells without B[a]P were analyzed.

Abb. 8: Relative Änderung der CYP450 Aktivität. Die Haut wurde gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen und 8-MOP mit/ohne UV-Bestrahlung exponiert. Die statistische Signifikanzberechnung bezieht sich auf den UV-Effekt an unbestrahlter Haut, auf den B[a]P/8-MOP-Effekt an unbestrahlter Haut und auf den kombinierten Effekt einer B[a]P/8-MOP-UV-Exposition gegenüber unbestrahlter Haut (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Abb. 9: Relative Änderung der Viabilität anhand der LDH - Freisetzung und des Gehalts an Formazan (MTT). Die Haut wurde gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen und 8-MOP mit/ohne UV-Bestrahlung exponiert. Die statistische Signifikanzberechnung bezieht sich auf den UV-Effekt an unbestrahlter Haut, auf den B[a]P/8-MOP-Effekt an unbestrahlter Haut und auf den kombinierten Effekt einer B[a]P/8-MOP-UV-Exposition gegenüber unbestrahlter Haut (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). 20 / 39

Abb. 10: Relative Änderung von Parametern des oxidativen Haushalts. Die Haut wurde gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen und 8-MOP mit/ohne UV-Bestrahlung exponiert. Die statistische Signifikanzberechnung bezieht sich auf den UV-Effekt an unbehandelter Haut, auf den B[a]P/8-MOP-Effekt an unbestrahlter Haut und auf den kombinierten einer B[a]P/8-MOP-UV-Exposition gegenüber unbestrahlter Haut (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). GHS: reduziertes Glutathion; GSSG: oxidiertes Glutathion

Abb. 11: Relative Änderung der Phosphorylierung des DNA-Reparatur Histons γ H2AX. Die Haut wurde gegen verschiedene B[a]P-Konzentrationen und 8-MOP mit/ohne UV-Bestrahlung exponiert. Die statistische Signifikanzberechnung bezieht sich auf den UV-Effekt an unbehandelter Haut, auf den B[a]P/8-MOP-Effekt an unbestrahlter Haut und auf den kombinierten Effekt einer B[a]P/8-MOP-UV-Exposition gegenüber unbestrahlter Haut (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Fig. 12: Metabolic changes of skin cells due to different influence factors: irradiation, ageing, xenobiotics and skin diseases. Explanation of numbering in the figure (please see publication); Abbreviation: 6-PGL, 6-phosphogluconolactone; Arg, arginine; Asp, aspartate; CoA, coenzyme A; Cys, cysteine; DAG, diacylglycerol; FA, fatty acid; FPP, farnesyl pyrophosphate; G-6-P, glucose-6-phosphate; G6PDH, glucose 6 phosphate dehydrogenase; Glc, glucose; GlcCer, glucosylceramide; Glu, glutamate; GPX4, glutathione peroxidase 4; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; GSSG, oxidized glutathione; IPP, isopentyl pyrophosphate; LacCer, lactosylceramide; LPC, lysophosphatidylcholine; LysoPC, lysophosphatidylcholine; LysoPE, lysophosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PC-P, phosphatidylcholine plasmologen; PE, phosphatidylethanolamine; PE-P, phosphatidylethanolamine; PEP, phosphoenolpyruvate; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate; PS, phosphatidylserine; R-5-P, ribulose 5 phosphate; SM, sphingomyelin; SM, sphingomyelin; TAG, triacylglycerol.

Fig. 13: Volcano plot aller Expositionen. Der Volcano Plot kombiniert die Ergebnisse der Fold-Change (FC)-Analyse und der t-Tests in einem Diagramm, das eine intuitive Auswahl signifikanter Merkmale auf der Grundlage entweder der biologischen Signifikanz, der statistischen Signifikanz oder beider ermöglicht. **A)** KeratinoSensTM: Kontrolle vs. 0,004 μ M B[a]P; **B)** KeratinoSensTM: Kontrolle vs. 0,004 MM B[a]P+UV; **C)** KeratinoSensTM: Kontrolle vs. 4 μ M B[a]P; **D)** KeratinoSensTM: Kontrolle vs. 4 μ M B[a]P+UV; **E)** U937: Kontrolle vs. 0,004 μ M B[a]P; **F)** U937: Kontrolle vs. 0,004 μ M B[a]P+UV; **G)** U937: Kontrolle vs. 0,004 μ M B[a]P; **H)** U937: Kontrolle vs. 4 μ M B[a]P+UV.

Abb. 14: Exemplarisch wurden die Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) der regulierten Metabolite in KeratinoSensTM-Zellen nach der Exposition gegen 0,004 μ M B[a]P (**links**) und 0,004 μ M B[a]P + UV (**rechts**) dargestellt.

Abb. 15: Exemplarisch wurden die VIP (variable importance in projection) score Diagramme von den regulierten Metaboliten in KeratinoSensTM-Zellen nach Exposition gegen 0,004 μ M B[a]P ohne/mit UV dargestellt.

Abb. 16: Mit MetaboAnalyst erstellte Darstellung der Stoffwechselwege. Die Diagramme zeigen verschiedene Veränderungen der Stoffwechselwege, die durch die Exposition von KeratinoSensTM-Zellen gegen 0,004 μ M B[a]P ohne/mit UV-Bestrahlung induziert wurden. Die x-Achse stellt den Wert für die Auswirkung der Stoffwechselwege dar, der aus der topologischen Analyse der Stoffwechselwege berechnet wurde, und die y-Achse ist der Logarithmus des P-Werts, der aus der Analyse der *Enrichment Analyse* erhalten wurde. Die Wege, die am stärksten verändert wurden, sind sowohl durch einen hohen log(p)-Wert als auch durch einen hohen Impact-Wert gekennzeichnet (oberer rechter Bereich). **(A)** 4 nM B[a]P; **(B)** 4 nM B[a]P+UV

Figure 17. Integrated schematic illustration of metabolic alterations in glutathione (A) pathways induced by KeratinoSensTM cells exposed to different B[a]P concentration and UV irradiation. The boxplots indicate the differential normalized concentration ratios of selected metabolites in the control group (red, n = 3) versus the exposure groups (green, n = 3). Abbreviations: reactive oxygen species (ROS), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP); reduced form of NADP (NADPH).

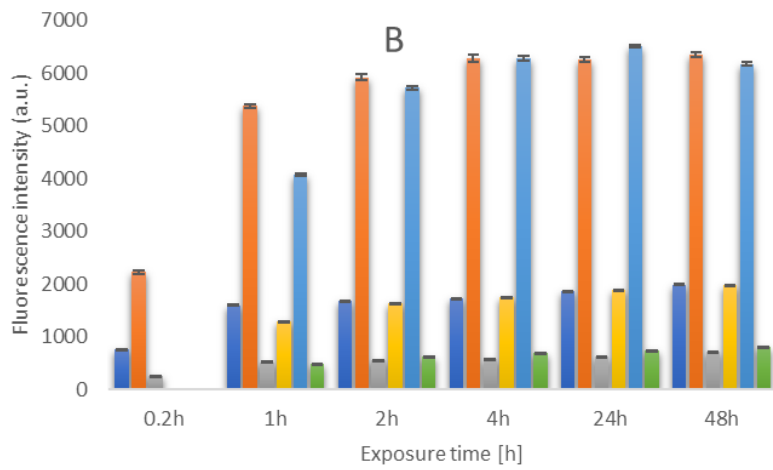
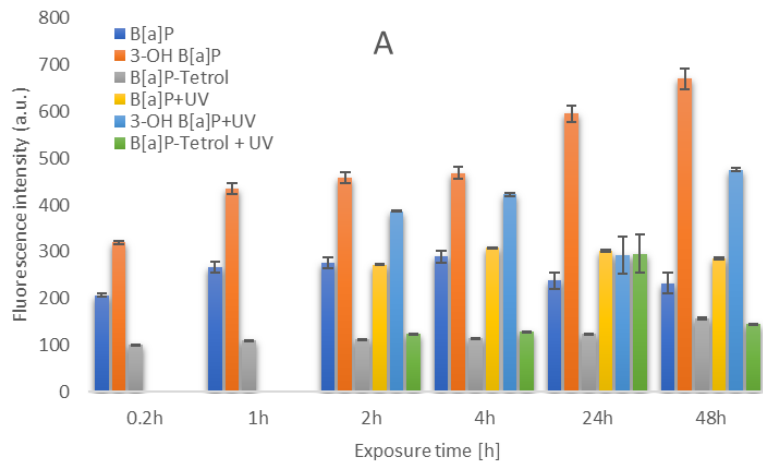


Figure 1:

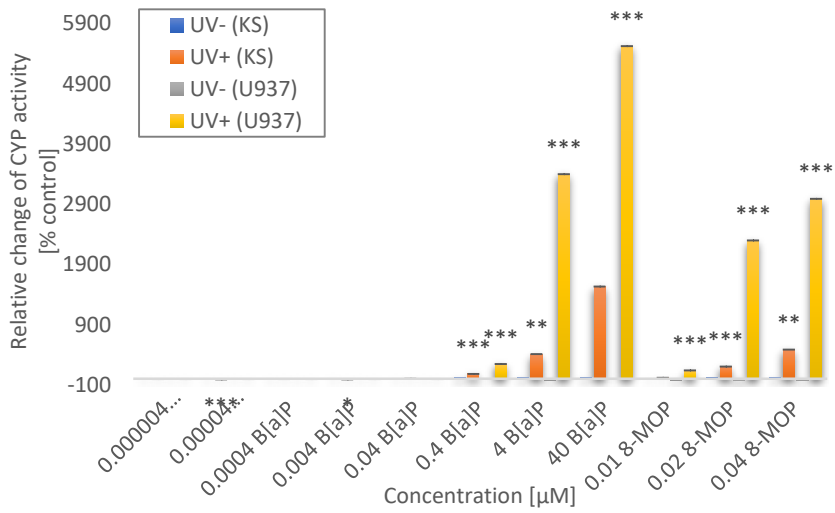


Figure 2:

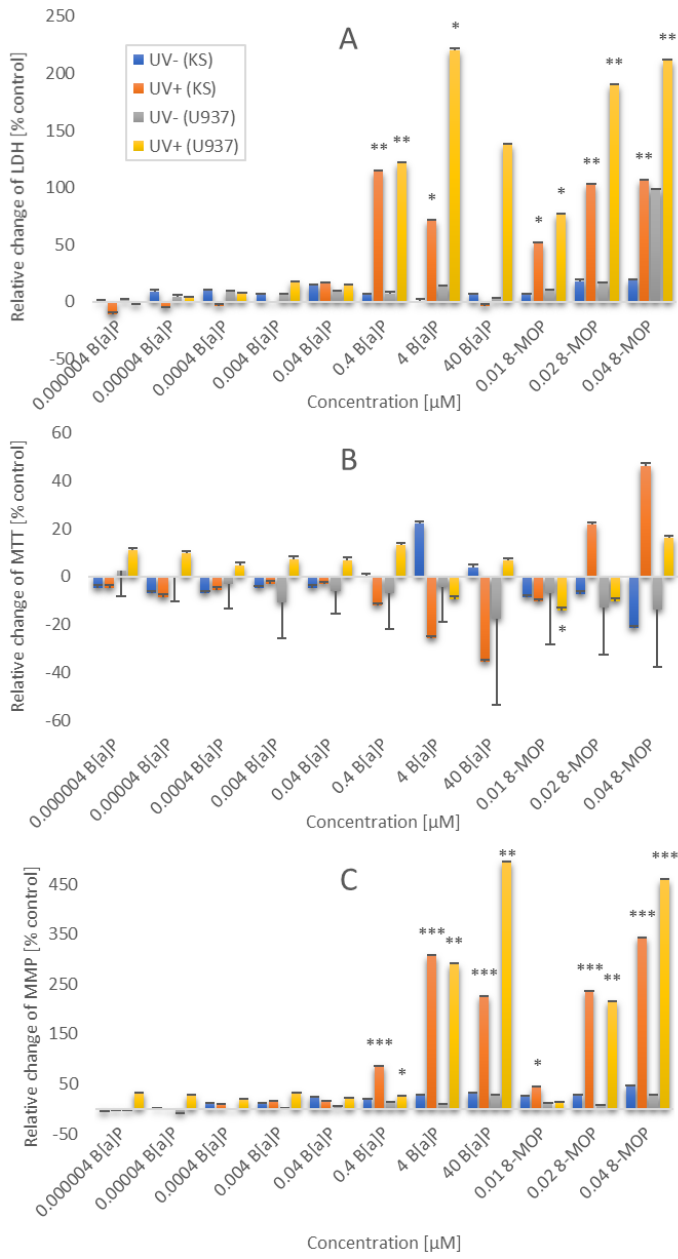


Figure 3

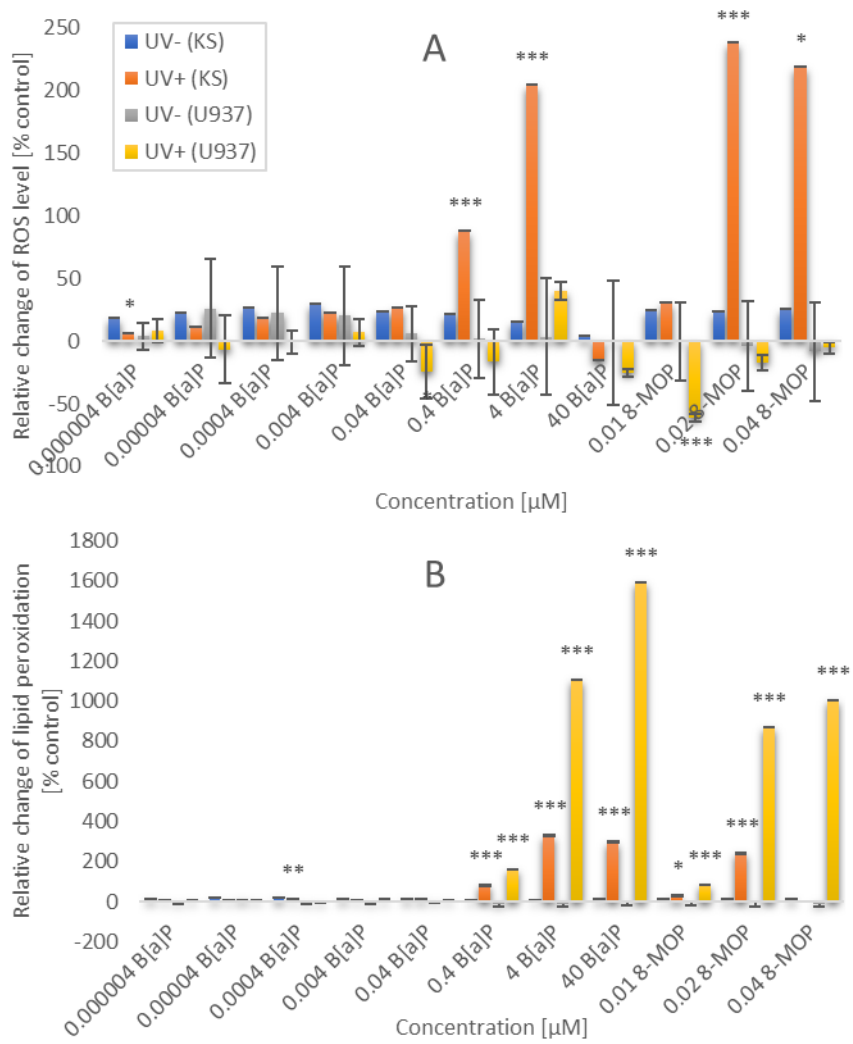


Figure 4

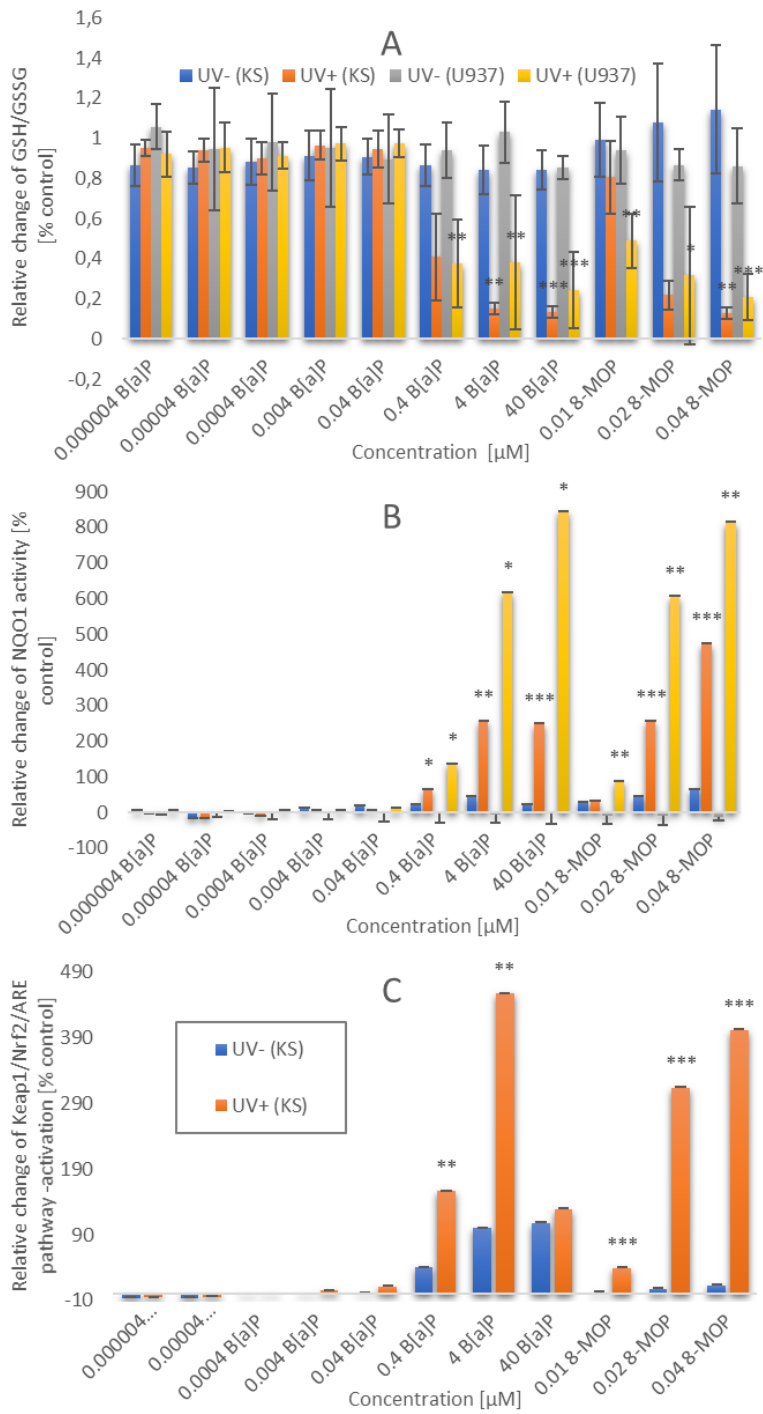


Figure 5

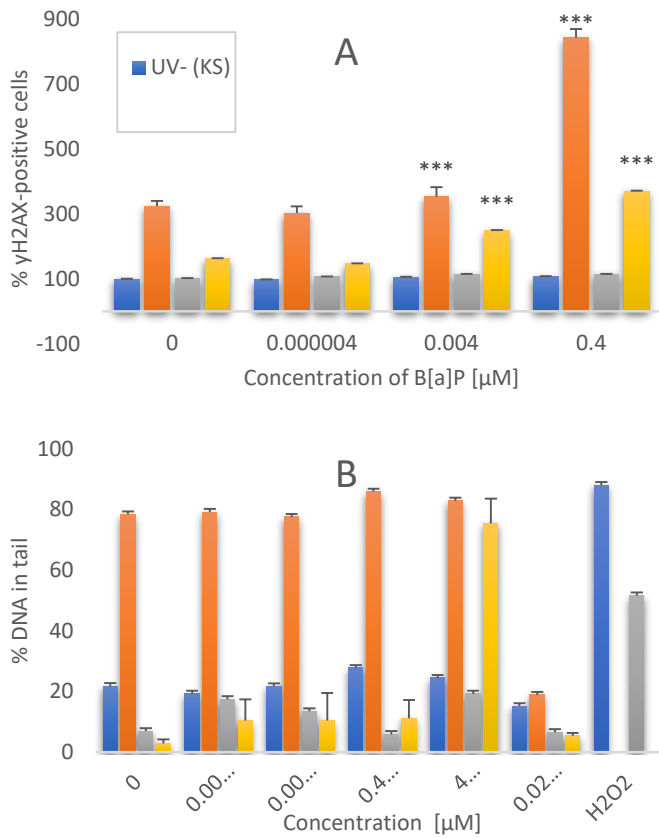


Figure 6

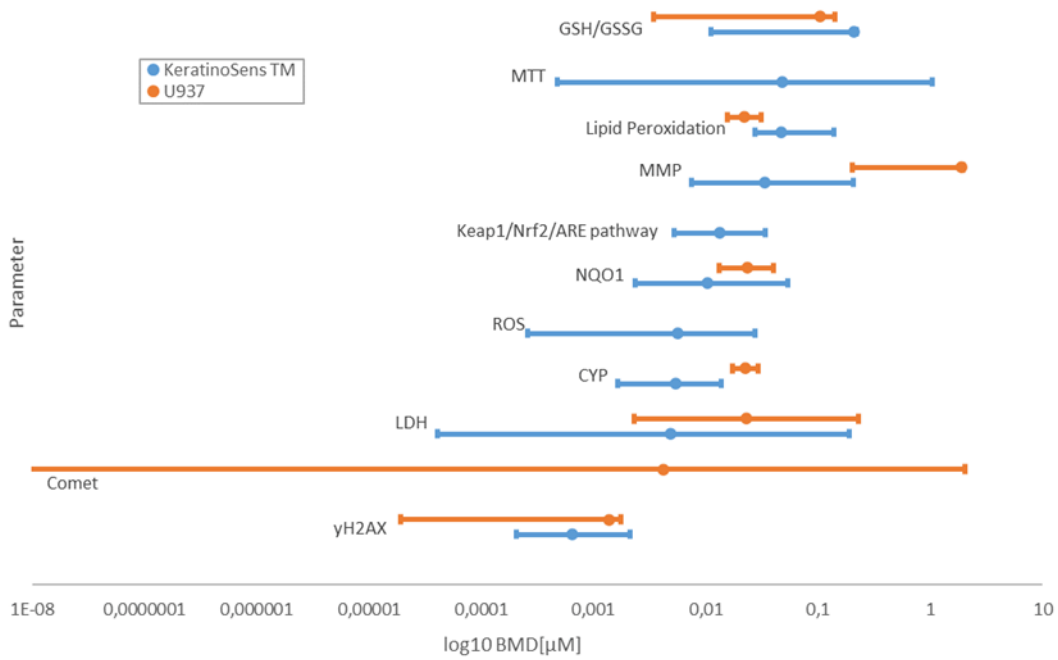


Figure 7

Table 2: BMDs for each endpoint and both cell lines with corresponding BMDLs

KertinoSens™				U937			
Endpoint/Assay	Best Model	BMD [μM]	BMDL [μM]	Endpoint/Assay	Best Model	BMD [μM]	BMDL [μM]
γH2AX	Hill m3-	0.0006	0.0002	γH2AX	Hill m5-	0.001	0.00002
LDH	Expon. m3-	0.0048	0.0000	COMET	Expon. m3-	0.004	0.00000
CYP	Hill m5-	0.0054	0.0017	Lipid Peroxidation	Hill m5-	0.022	0.01570
ROS	Expon. m5-	0.0056	0.0003	CYP	Hill m5-	0.023	0.01720
NQO1	Expon. m5-	0.0103	0.0023	LDH	Expon. m5-	0.023	0.00230
Keap1/Nrf2/ARE pathway	Expon. m5-	0.0132	0.0053	NQO1	Hill m5-	0.023	0.01320
MMP	Expon. m5-	0.0340	0.0075	GSH/GSSG	Hill m5-	0.106	0.00342
Lipid Peroxidation	Expon. m5-	0.0469	0.0275	MMP	Expon. m5-	1.901	0.20200
MTT	Expon. m3-	0.0480	0.0005				
GSH/GSSG	Expon. m5-	0.2094	0.0111				

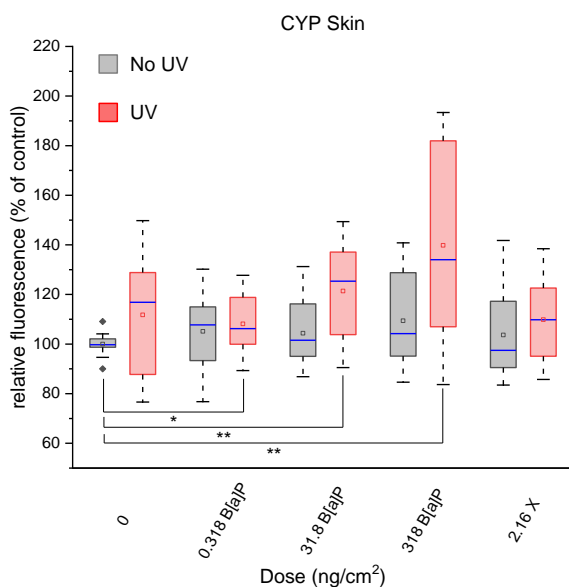


Abb. 8

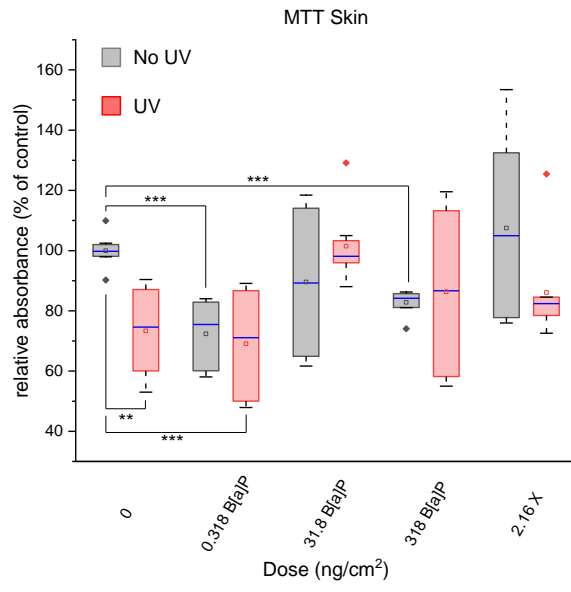
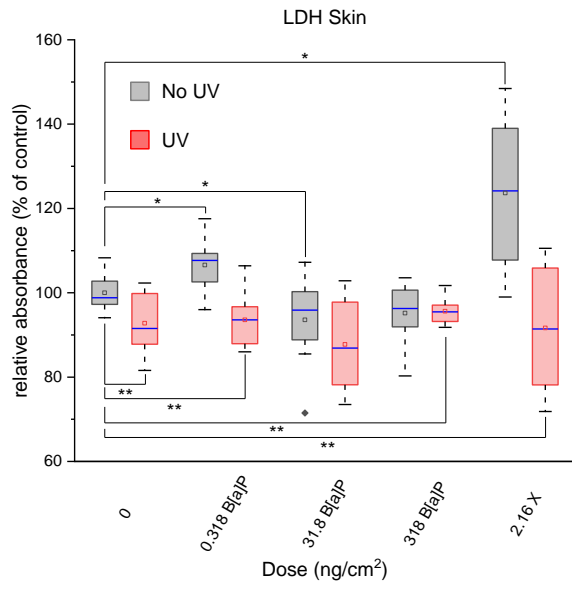


Abb. 9

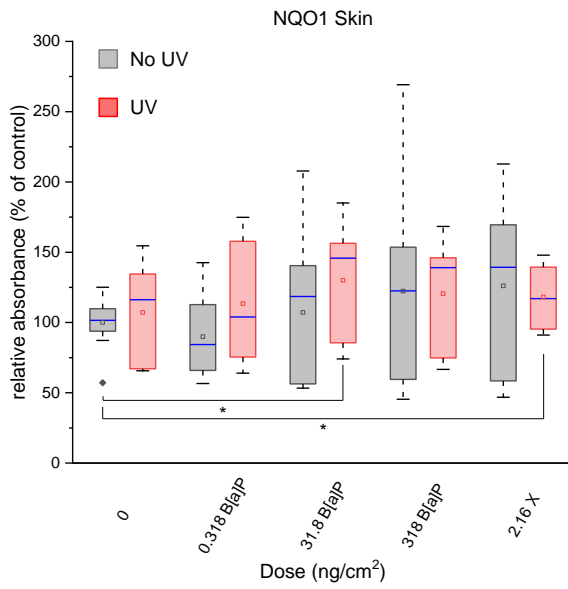
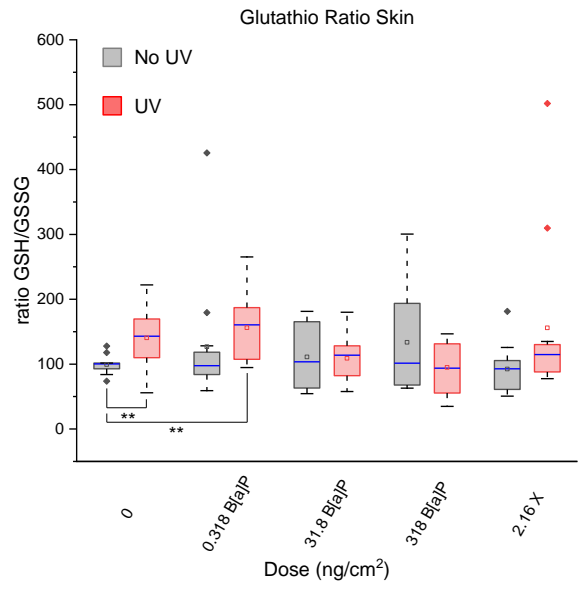
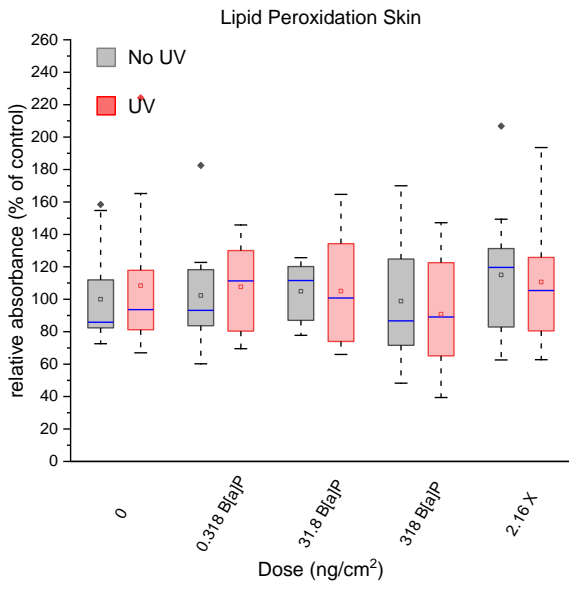


Abb. 10

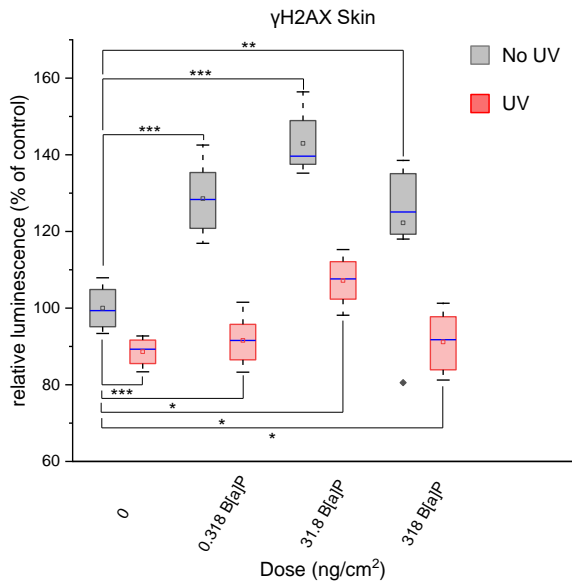


Abb. 11

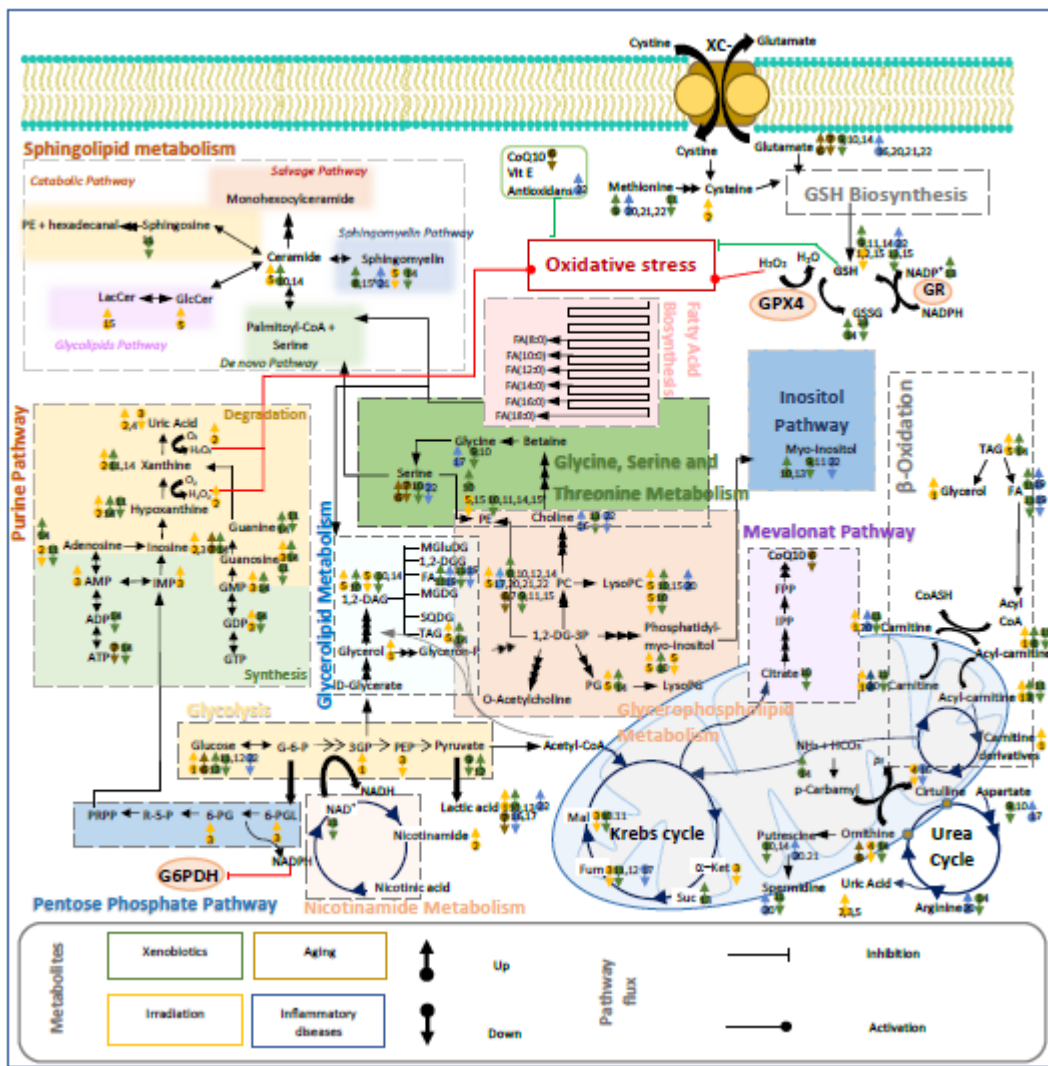


Abb. 12

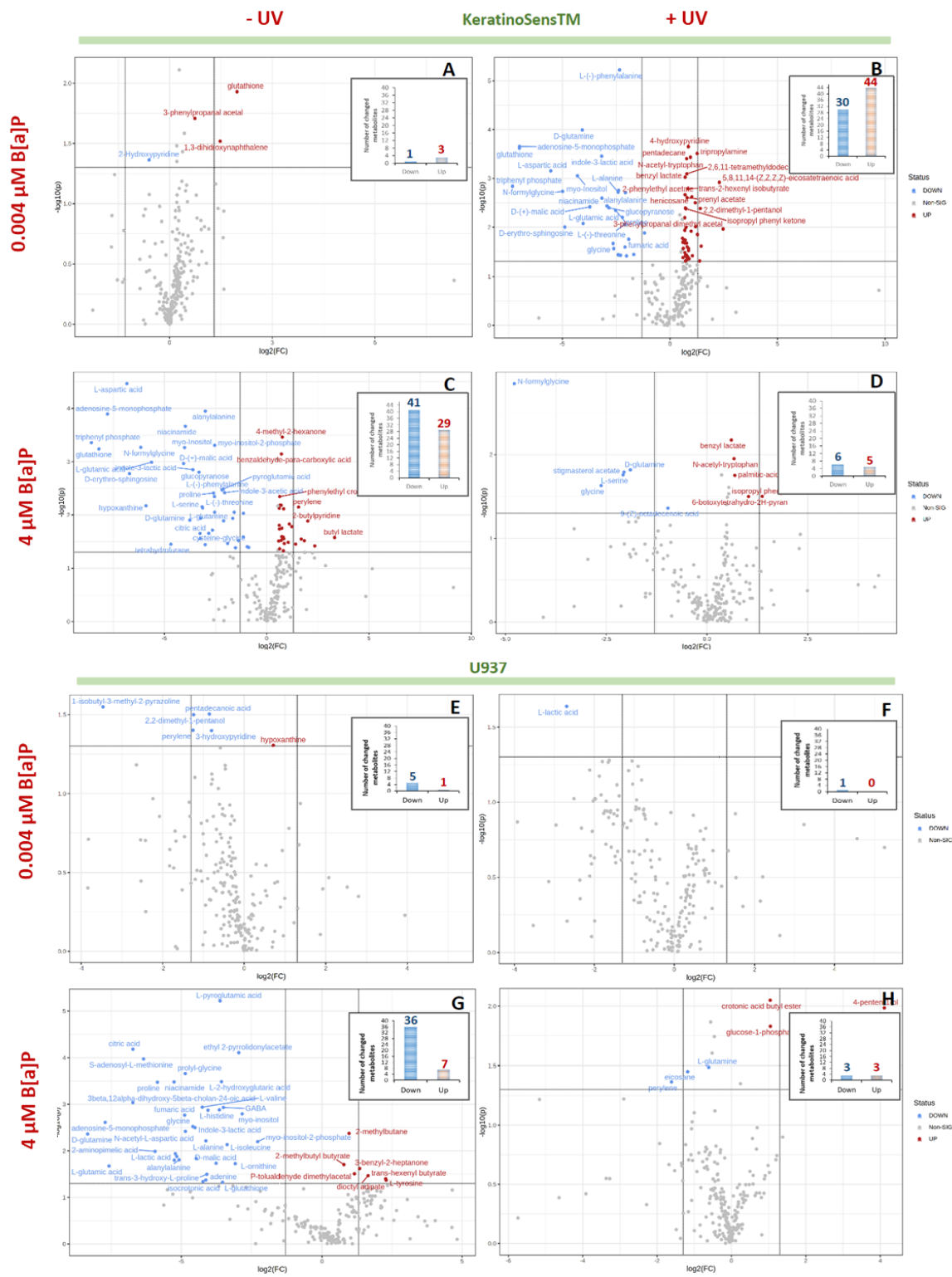


Abb. 13

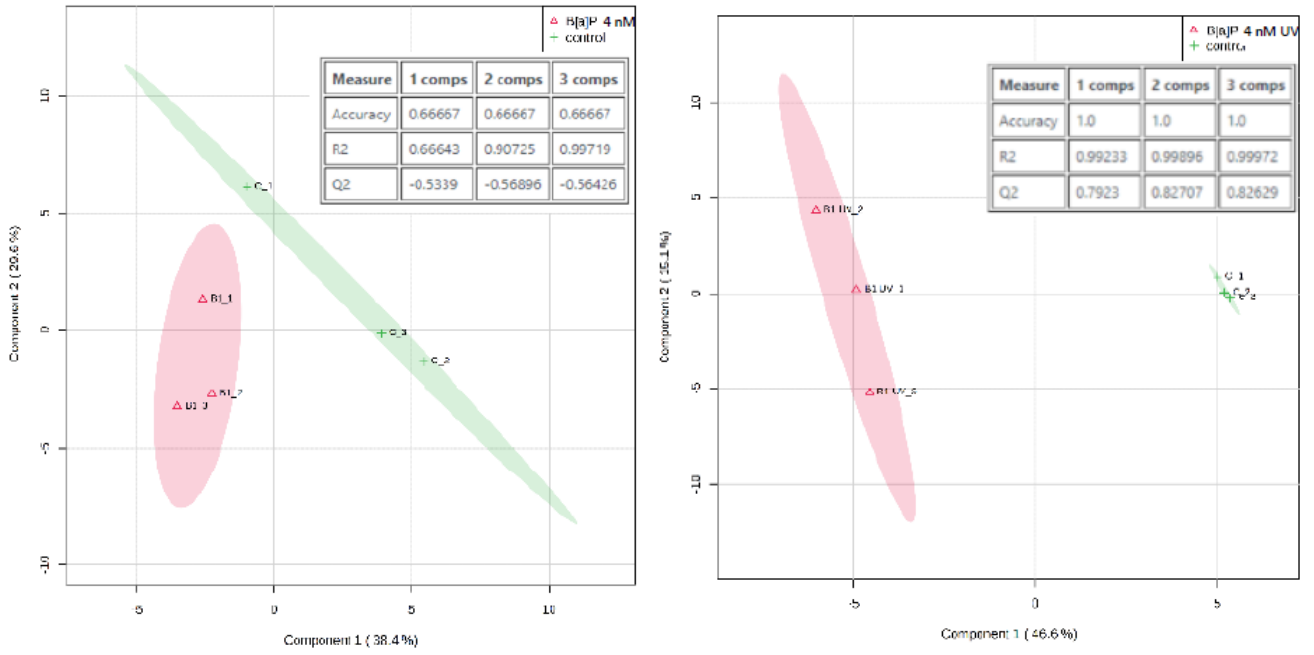


Abb. 14

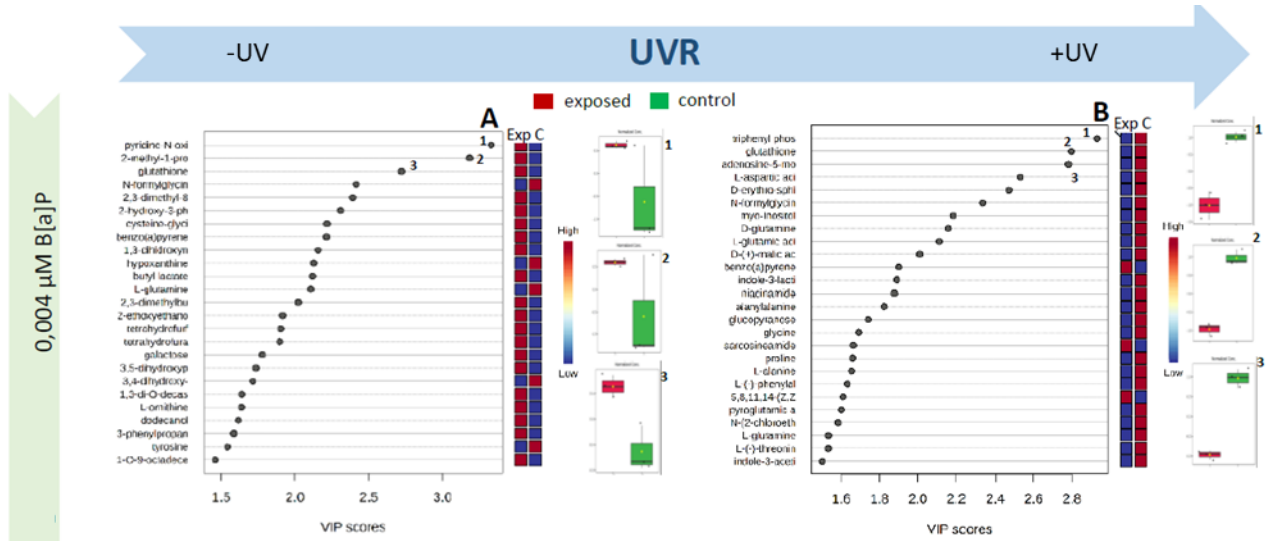


Abb. 15

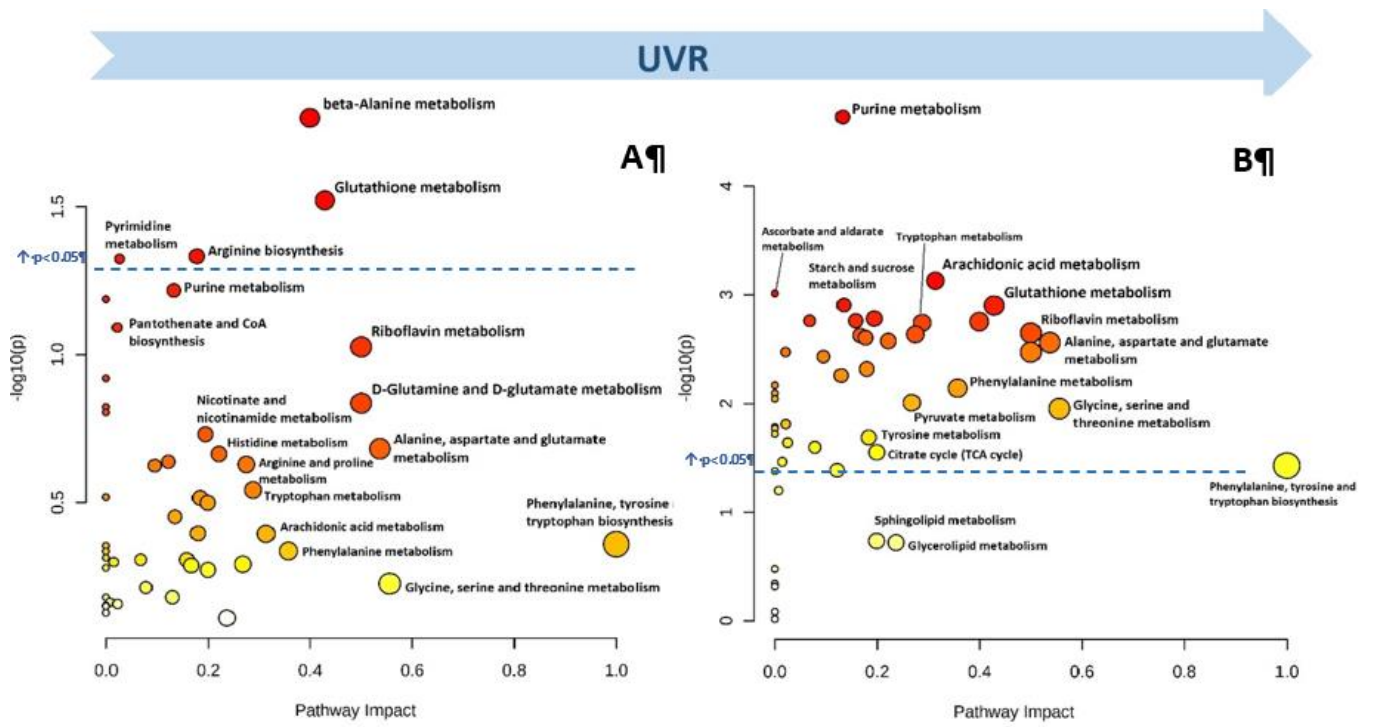


Fig. 17

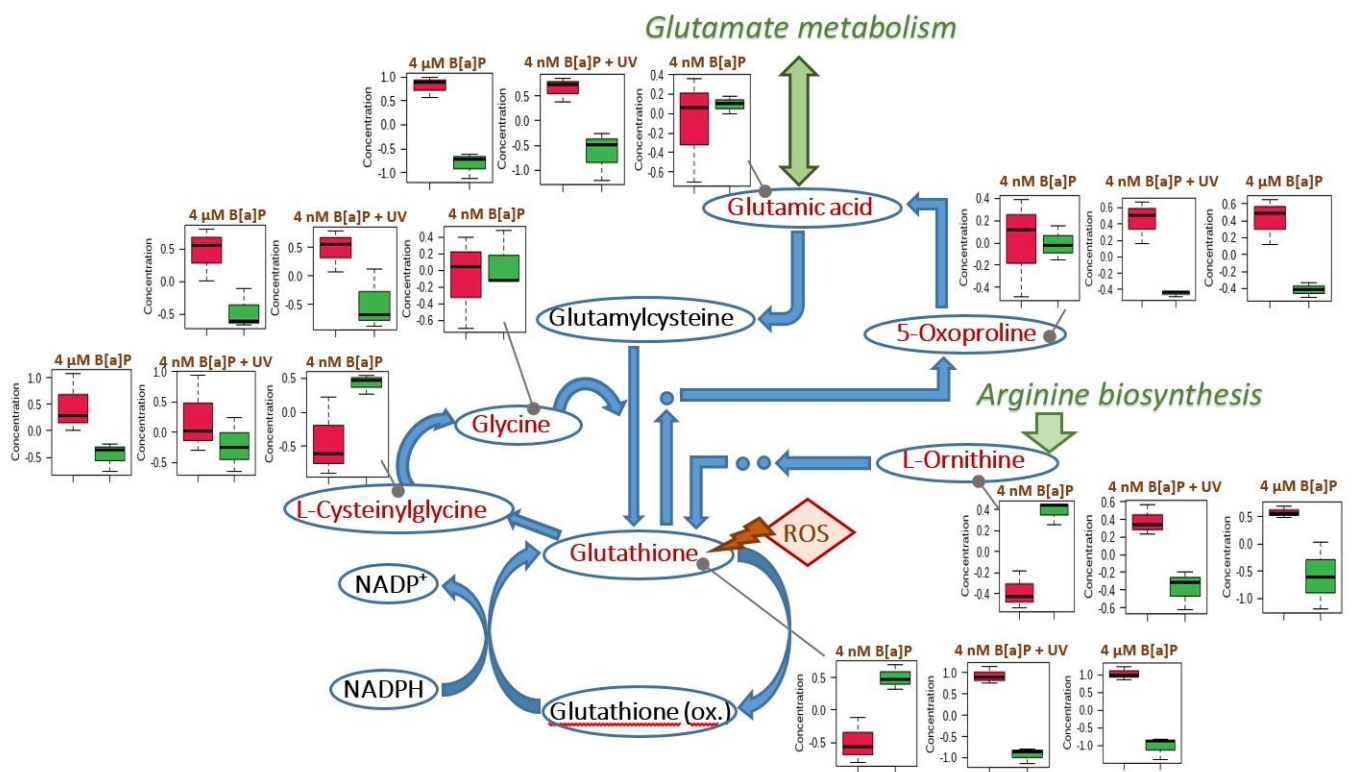


Fig. 18