

Deutsches Institut für Ernährungsforschung
Abteilung Ernährungstoxikologie

**Konstruktion und Charakterisierung
transgener Mauslinien für humane Sulfotransferasen
als Modellsysteme für eine SULT-vermittelte
metabolische Aktivierung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Molekulare Toxikologie"

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Gisela Dobbernack

Potsdam, 2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3044/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-30447
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-30447>]

Inhalt

INHALT	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Fremdstoffmetabolismus	1
1.1.1 Phasen und Enzymfamilien des Fremdstoffmetabolismus.....	2
1.1.2 Sulfotransferasen.....	3
1.1.3 SULT-vermittelte Genotoxizität.....	4
1.1.3.1 Das heterozyklische aromatische Amin PhIP	5
1.1.3.2 1-HMP als Metabolit des PAK 1-MP	7
1.1.4 SULT1A-Formen.....	9
1.1.4.1 SULT1A1	9
1.1.4.2 SULT1A2.....	10
1.1.5 SULT1B1	11
1.2 Modellsysteme in der Toxikologie	11
1.2.1 Modellsysteme für fremdstoffmetabolisierende Enzyme	12
1.2.2 Transgene Tiermodelle	13
1.3 Zielstellung	16
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.4 Lösungen	21
2.1.5 Enzyme	22
2.1.6 Antikörper.....	22
2.1.7 DNA-Leitern	23
2.1.8 Reaktionskits.....	23
2.1.9 Oligonukleotide	23
2.1.10 PAC-Konstrukte	25
2.1.11 Biologische Materialien	25
2.1.12 Bakterien.....	25

2.1.13	Software.....	25
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1.1	DNA-Isolierung aus Geweben für das ³² P-Postlabelling.....	26
2.2.1.2	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen.....	26
2.2.1.3	DNA-Isolierung durch Aussalzen.....	26
2.2.1.4	Präparation von PAC- und Plasmid-DNA.....	26
2.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.2.1.6	Erzeugung der transgenen Mauslinien.....	27
2.2.1.7	Zucht der transgenen Mauslinien zur Homozygotie.....	27
2.2.1.8	PCR-Experimente.....	28
2.2.1.9	Echtzeit-PCR.....	28
2.2.1.10	Untersuchung des Integrationsorts mittels Genome Walking.....	29
2.2.1.11	Elektrophorese von Nukleinsäuren.....	29
2.2.1.12	Fluoreszenz- <i>In-Situ</i> -Hybridisierung.....	30
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.2.2.1	Proteinbestimmung.....	30
2.2.2.2	Präparation von subzellulären Fraktionen aus Mäusegeweben.....	30
2.2.2.3	SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion.....	30
2.2.2.4	PAP ³⁵ S-Assay zur Messung der Sulfotransferase-Aktivität.....	31
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.3.1	Kultivierung und Erzeugung von Mitosestadien muriner Lymphozyten.....	32
2.2.4	Immunhistochemie.....	32
2.2.4.1	Vorbereitung der Proben.....	32
2.2.4.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	33
2.2.4.3	Immunhistochemische Färbung.....	33
2.2.4.4	Mikroskopie und Mikrophotographie.....	34
2.2.5	Tierversuche.....	34
2.2.5.1	Tiertötung zur Organentnahme.....	34
2.2.5.2	Tierversuche mit PhIP und 1-HMP.....	35
2.2.6	Bestimmung von DNA-Addukten mittels ³² P-Postlabeling.....	35
2.2.6.1	Bestimmung von PhIP-DNA-Addukten.....	35
2.2.6.2	Bestimmung von 1-HMP-DNA-Addukten.....	36
2.2.7	Statistik.....	36
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	Konstruktion der transgenen Mauslinien.....	37
3.1.1	Charakterisierung und Bearbeitung der Transfektionsvektoren.....	37

3.1.1.1	<i>SULT1A1/1A2</i> -Locus.....	38
3.1.1.2	<i>SULT1B1</i> -Locus	40
3.1.2	Genotypisierung der Founder und der ersten Filialgeneration	41
3.1.2.1	Genotypisierung der <i>hSULT1A1/1A2</i> -transgenen Mäuse.....	41
3.1.2.2	Genotypisierung der <i>hSULT1B1</i> -transgenen Mäuse	42
3.1.3	Zucht der transgenen Mauslinien	44
3.1.3.1	Zucht zur Homozygotie	44
3.1.3.2	Zucht von Sublinien in der Linie 714 tg- <i>hSULT1A1/1A2</i>	45
3.2	Molekularbiologische Charakterisierung	46
3.2.1	Bestimmung des chromosomalen Integrationsorts des Transgens	46
3.2.2	Bestimmung der Kopienzahl des Transgens.....	48
3.2.2.1	Untersuchung des Genlocus der Transgen-Integration	50
3.3	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	55
3.3.1	Immunblot-Analyse der hSULT-Expression in den transgenen Mauslinien	55
3.3.1.1	Transgen-Expression in den <i>hSULT1A1/1A2</i> -transgenen Mauslinien	55
3.3.1.2	Transgen-Expression in den <i>hSULT1B1</i> -transgenen Mauslinien	59
3.3.2	Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation der SULT-Expression	62
3.3.2.1	<i>hSULT1A1</i> -Expression in Gewebeschnitten der <i>hSULT1A1/1A2</i> -tg Linie 7... ..	62
3.3.2.2	<i>hSULT1B1</i> -Expression im Kolon der <i>hSULT1B1</i> -tg Linie 12.....	63
3.3.3	Aktivitätsnachweis für das heterolog exprimierte Enzym SULT1A1.....	68
3.4	Genotoxizitätsexperimente mit <i>hSULT1A1/1A2</i>-transgenen Mäusen.....	69
3.4.1	PhIP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen	69
3.4.1.1	Vorversuche	70
3.4.1.2	Hauptversuch	72
3.4.2	1-HMP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen	74
4	DISKUSSION.....	78
4.1	Konstruktion der transgenen Mauslinien	78
4.2	Charakterisierung und Zucht der transgenen Linien.....	81
4.2.1	Bestimmung der chromosomalen Integration der Transgen-Konstrukte.....	81
4.2.2	Zucht zur Homozygotie	82
4.2.3	Bestimmung der Kopienzahl des Transgens.....	83
4.2.4	Untersuchung des Genlocus der Transgen-Integration.....	84
4.3	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	87
4.3.1	Immunblot-Analyse der hSULT-Expression in den transgenen Mauslinien	87
4.3.2	Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation der SULT-Expression	89
4.3.3	Aktivitätsnachweis für das heterolog exprimierte Enzym SULT1A1.....	92

4.4	Genotoxizitätsexperimente mit <i>hSULT1A1/1A2</i>-transgenen Mäusen.....	93
4.4.1	1-HMP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen	93
4.4.2	PhIP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen	98
4.4.2.1	Tierversuch.....	100
4.4.2.2	PhIP-DNA-Addukte in der Leber	101
4.4.2.3	Extrahepatische PhIP-DNA-Addukte	103
4.4.2.4	DNA-Addukte als Hinweis auf gewebespezifische Kanzerogenität?	110
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	113
5.1	Zusammenfassung.....	113
5.2	Summary.....	115
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
7	TABELLENVERZEICHNIS	120
8	LITERATURVERZEICHNIS	121
	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	136
	DANKSAGUNG	137

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BAC	Bacterial artificial chromosome
CPM	counts per minute
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DTT	Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Commission Number
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	Östrogen-Sulfotransferase
ETOX	Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE
FISH	Fluoreszenz- <i>In-Situ</i> -Hybridisierung
HMP	Hydroxymethylpyren
HRP	Horse radish peroxidase
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
MN	Micrococcus-Nuklease
MP	Methylpyren
NAT	N-Acetyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAC	Bacteriophage P1-derived artificial chromosome
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphate buffered saline
PEI	Polyethylenimin
PHA-M	Phytohämagglutinin-M
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin
RPCI	Roswell Park Center Institute
RT	Raumtemperatur
<i>S. thyphimurium</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SKY	Spectral-Karyotyping
SMP	Sulfoxymethylpyren
SPD	Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (spleen phosphodiesterase)
SULT	Sulfotranferase
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TE	Tris-EDTA
tg bzw. TG	Transgen
TLC	Thinlayer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
VT	Volumenteile
w/v	weight per volume
wt bzw. WT	Wildtyp (genetisch unveränderte Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N)

1 Einleitung

1.1 Fremdstoffmetabolismus

Als Fremdstoffe (Xenobiotika) im pharmakologisch-toxikologischen Sinn werden alle Substanzen bezeichnet, die ein Organismus, beispielsweise über die Nahrung oder die Atmung, aufnimmt, die er jedoch nicht als Bausteine oder Energielieferanten gewinnbringend nutzen kann. Gefahren, die von der Aufnahme solcher Xenobiotika ausgehen können, sind eine Akkumulation „chemischen Ballasts“ in Zellen und Geweben sowie eine Manipulation des Organismus durch eine pharmako- bzw. toxikologische Aktivität dieser Substanzen (RUSHMORE und KONG 2002). Um sich vor diesen Einflüssen zu schützen, muss der Organismus Fremdstoffe aktiv ausscheiden. Die Hauptausscheidungswege für Fremdstoffe wie auch für endogene Abbauprodukte stellen im Säugerorganismus die renale sowie die biliäre Elimination dar. Die Voraussetzung für beide Eliminationswege ist eine Reduzierung der passiven Membrangängigkeit der auszuscheidenden Substanzen. Aus diesem Grund besteht für den Organismus die Notwendigkeit, unpolare Fremdstoffe und endogene Abbauprodukte in eine polare, wasserlösliche Form zu überführen. Zu diesem Zweck hat sich bereits früh in der Evolution das System der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme entwickelt (NEBERT 1994). Dieses Enzymsystem muss den schwierigen und nicht immer miteinander zu vereinbarenden Anforderungen gerecht werden, einerseits Substanzen unterschiedlichster chemischer Struktur in polare, wasserlösliche Formen überführen zu können, andererseits aber zu vermeiden, diese Substanzen zu chemisch reaktiven oder biologisch aktiven Metaboliten umzusetzen. Zur Erfüllung dieser Aufgaben hat sich ein System großer Enzymfamilien mit überlappenden Substrat-Spezifitäten herausgebildet, deren zahlreiche Mitglieder jedoch meist nur eine sehr geringe Substrat-Umsatzrate besitzen. Die Expression dieser Enzyme ist häufig durch das Vorliegen des Substrats induzierbar (PROCHASKA und TALALAY 1988), so dass sie erst bereitgestellt werden, wenn dafür eine Notwendigkeit vorliegt. Im Säugerorganismus ist die Leber als Zentrale des Stoffwechsels das Organ mit dem höchsten Anteil an Enzymen des Fremdstoffmetabolismus. Aber auch in Darm, Niere und Lunge, also in den Geweben, die mit der Aufnahme oder Ausscheidung von Fremdstoffen zu tun haben, werden fremdstoffmetabolisierende Enzyme stark exprimiert.

1.1.1 Phasen und Enzymfamilien des Fremdstoffmetabolismus

Damit eine aus dem Organismus zu eliminierende Substanz mit einem hydrophilen endogenen Baustein konjugiert werden kann, muss diese Substanz eine hierfür geeignete funktionelle Gruppe besitzen. Ist das nicht der Fall, dann wird in der als Funktionalisierung bezeichneten Phase I des Fremdstoffmetabolismus eine solche Gruppe in das Molekül eingeführt oder in ihm freigelegt (Abbildung 1). Enzyme, die diese Reaktionen durchführen, sind Oxidoreduktasen, wie beispielsweise die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) und die Cyclooxygenasen (COX) oder Hydrolasen, wie z.B. die Ester- oder Epoxidhydrolasen. Je nach eingeführter funktioneller Gruppe entstehen in diesem Schritt Elektrophile (z.B. Epoxide oder α - β -ungesättigte Carbonylverbindungen) oder Nukleophile (durch Einführung von z.B. Hydroxyl-, Sulfhydryl- oder Aminogruppen). Bei beiden Substanztypen besteht die Gefahr, dass sie im Organismus eine unerwünschte Wirkung ausüben können. Elektrophile können eine Reaktivität gegenüber endogenen Makromolekülen wie Proteinen, DNA oder RNA aufweisen und dadurch zyto- oder genotoxisch wirken (MILLER 1970). Nukleophile weisen zwar in der Regel keine Reaktivität gegenüber endogenen Makromolekülen auf, besitzen aber dafür Strukturelemente, die mit endogenen Rezeptoren in Wechselwirkung treten und damit eine biologische Aktivität besitzen können. In der Phase II des Fremdstoffmetabolismus wird die funktionelle Gruppe des Substrats mit einem hydrophilen anionischen Baustein konjugiert. Dadurch wird meist die chemische Reaktivität oder biologische Aktivität der vorausgegangenen Funktionalisierung aufgehoben und der detoxifizierte Metabolit kann vom Organismus ausgeschieden werden. Die Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus sind die Transferasen. Die meisten elektrophilen Substrate werden von Glutathion-S-Transferasen (GST) mit dem endogenen Tripeptid Glutathion konjugiert. Die quantitativ wichtigste Konjugationsreaktion für nukleophile Substanzen stellt die Glucuronidierung durch die UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) dar. Dabei wird Glucuronsäure aus dem Coenzym α -D-UDP-Glucuronsäure auf das Substrat übertragen. Das Substratspektrum der Sulfotransferasen (SULT) stimmt weitgehend mit dem der UGT überein. Da sich die vorliegende Arbeit mit Mitgliedern dieser Enzymfamilien beschäftigen wird, wird im anschließenden Abschnitt genauer auf sie eingegangen. N-Acetyltransferasen (NAT) katalysieren die Übertragung einer Acetylgruppe aus dem Coenzym Acetyl-CoA auf Amine und Hydroxylamine. Von eher untergeordneter Bedeutung sind die Konjugation mit Aminosäuren durch Acyl-CoA-Aminosäure-N-Acyltransferasen, sowie die Methylierung durch Methyltransferasen. Als Phase III des Fremdstoffmetabolismus

wird der gerichtete Transport der finalen Metaboliten aus der Zelle heraus, der über spezielle Carriersysteme abläuft, bezeichnet.

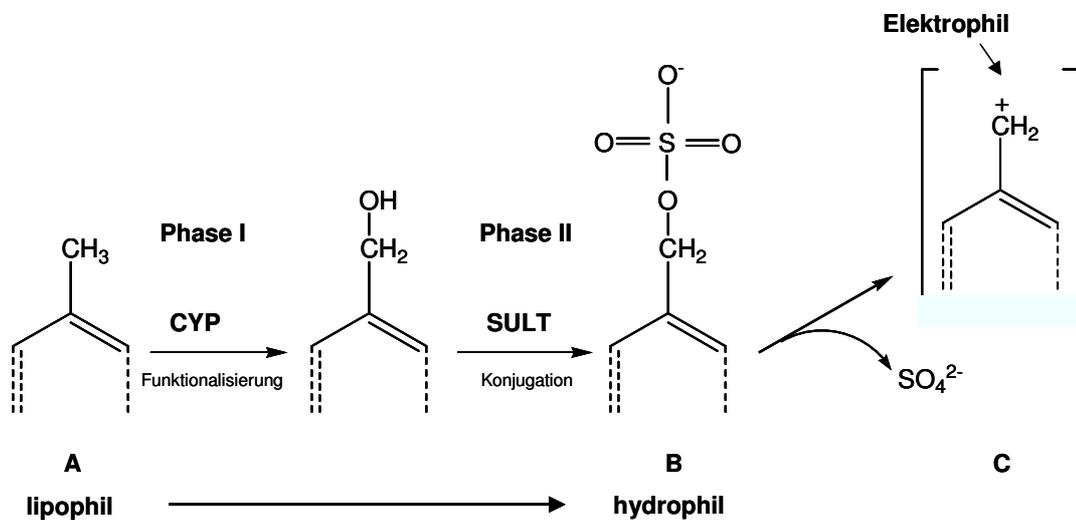


Abbildung 1: In den Phasen I und II des Fremdstoffmetabolismus wird die auszuscheidende Substanz von einer lipophilen (A) in eine hydrophile (B) Form überführt, die vom Organismus renal oder biliär eliminiert werden kann. Als Beispiel für die Phase I ist eine CYP-vermittelte Funktionalisierung und für die Phase II eine Konjugation durch eine SULT-Form dargestellt. In manchen chemischen Verbindungen kann die bei der O-Konjugation entstandene Sulfatgruppe eine gute Abgangsgruppe darstellen, insbesondere wenn das dabei gebildete Carbokation (C) resonanzstabilisiert ist. Dieses Kation ist ein starkes Elektrophil und kann Reaktionen mit zellulären Nucleophilen wie DNA oder Proteinen eingehen.

1.1.2 Sulfotransferasen

Sulfotransferasen katalysieren die Übertragung einer Sulfonyl-Gruppe aus ihrem Co-Substrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) (ROBBINS und LIPMANN 1957) auf Hydroxyl-, Amino-, Sulfhydryl- und N-Oxidgruppen ihrer Substrate (DODGSON und ROSE 1970; MULDER und JAKOBY 1990; FALANY 1997). Dazu binden der Akzeptor sowie der Donor (PAPS) der Sulfonyl-Gruppe an die Sulfotransferase, woraufhin das sulfonierte Produkt und 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP) freigesetzt werden. Anhand ihrer subzellulären Verteilung können die Sulfotransferasen in zwei Hauptklassen unterteilt werden: Die hauptsächlich frei im Zytosol der Zelle vorkommenden Sulfotransferasen und die Membran-assoziierten Sulfotransferasen des Golgi-Apparates. Die Aufgabe der letzteren ist die Modifikation von Makromolekülen wie z.B. die Sulfonierung von Tyrosin-Resten von Proteinen (NIEHRS *et al.* 1994) oder des Zuckerteils von Glykolipiden.

Die zytosolischen Sulfotransferasen (Enzyme Commission Number E.C.2.8.2) sulfonieren kleine endogene Substrate wie z.B. Steroide, Katecholamine oder Schilddrüsenhormone (COUGHTRIE *et al.* 1998), aber auch exogene Verbindungen und sind damit die für den Fremdstoffmetabolismus relevanten Enzyme. Neben der Elimination von Fremdstoffen und endogenen Molekülen ist als weitere Funktion der Sulfokonjugation die Inaktivierung von Hormonen, Neurotransmittern und Pharmaka anzuführen (WEINSHILBOUM 1986; RATGE *et al.* 1991; ROY 1992). Da eine solche Inaktivierung durch die enzymatische Wirkung von Sulfatasen reversibel ist, können Sulfokonjugate als Transport- und Speicherformen zum Einsatz kommen (DOOLEY *et al.* 2000). Alle zytosolischen Sulfotransferasen weisen Sequenzhomologien untereinander auf und können daher einer mit SULT bezeichneten gemeinsamen Superfamilie zugeordnet werden (YAMAZOE *et al.* 1994; WEINSHILBOUM *et al.* 1997; NAGATA und YAMAZOE 2000). Systematisch werden die SULT mit einer Ziffer für die Familie, einem Großbuchstaben für die Unterfamilie und einer Ziffer für das individuelle Enzym bezeichnet. Enzyme mit einer Sequenzidentität über 45% werden in die gleiche Familie, mit einer Sequenzidentität über 60% in die gleiche Unterfamilie eingeordnet (BLANCHARD *et al.* 2004). Ein Präfix vor dem systematischen Namen bezeichnet die Spezies (h für human, m für Maus). Für Säugetiere sind sechs SULT-Familien bekannt, von denen die Familien 1 (phenolische Substrate) und 2 (alkoholische Substrate) die größte Bedeutung haben. Für den Menschen sind bisher 12 *SULT*-Gene beschrieben worden, von denen die meisten in Clustern organisiert vorliegen (FREIMUTH *et al.* 2004). Sie werden häufig mit hoher Selektivität in bestimmten Zellen, Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert. Für mehrere humane SULT (1A1, 1A2, 1C2, 2A1) sind funktionell relevante genetische Polymorphismen bekannt.

1.1.3 SULT-vermittelte Genotoxizität

Bereits 1947 wurde eine Publikation über die Möglichkeit, dass Bioaktivierung und kovalente Bindung an Makromoleküle mit den Mechanismen der chemischen Kanzerogenese zu tun haben könnten, veröffentlicht (MILLER und MILLER 1947). Der erste identifizierte elektrophile Metabolit eines Kanzerogens war der Schwefelsäureester 2-Acetylaminofluoren-*N*-sulfat (DEBAUN *et al.* 1968; KING und PHILLIPS 1968). Die Rolle der Sulfotransferasen in der Bioaktivierung von Nager-Leberkanzerogenen wurde durch mehrere Studien wie dem Nachweis einer Reduktion addukturierter Makromoleküle durch SULT-Inhibition oder einer fehlenden Lebertumorigenität der Kanzerogene in PAPS-Synthese-defizienten Mäusen nachgewiesen (MILLER 1994). Der Grund für

die Reaktivität der Sulfatester ist der elektronenziehende Charakter der aus der *O*-Sulfonierung hervorgehenden Sulfatgruppe. Sie stellt in bestimmten Positionen verschiedener Moleküle eine ausgezeichnete Abgangsgruppe dar. Aus der heterolytischen Abspaltung der Sulfatgruppe resultiert ein stark elektrophiles Nitrenium- oder Carbonium-Ion. Vereinfacht wird die Abspaltung der Sulfatgruppe, wenn das entstehende Kation durch Mesomerie stabilisiert werden kann (GLATT 1997). Dies trifft beispielsweise auf Sulfatester benzylicher und allylicher Alkohole oder aromatischer Hydroxylamine zu. Diese Moleküle sind sehr kurzlebig und können mit zellulären Makromolekülen wie Proteinen oder DNA reagieren und dabei zyto- oder genotoxische Wirkungen entfalten (FALANY 1997; WEINSHILBOUM *et al.* 1997). Eine kovalente Bindung an die DNA, die als DNA-Adduktierung bezeichnet wird, kann die Funktion der DNA als Matrize für Replikation oder Transkription stören und Fehler bei DNA-Reparaturprozessen verursachen. So können Mutationen induziert werden, die, falls Onkogene oder Tumorsuppressorgene betroffen sind, die Initiation einer chemischen Kanzerogenese bewirken können. Im Folgenden wird speziell auf zwei Substanzen näher eingegangen, deren SULT-vermittelte Genotoxizität nachgewiesen wurde und die im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden sollen.

1.1.3.1 Das heterozyklische aromatische Amin PhIP

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) ist ein heterozyklisches aromatisches Amin (HAA). Die strukturelle Verwandtschaft der Verbindungen dieser Chemikalienfamilie liegt im Vorhandensein eines heterozyklischen aromatischen Ringes und einer exozyklischen Aminogruppe. Sie entstehen beim Erhitzen von Fleisch und Fisch in komplizierten Reaktionsabläufen, bei denen Zucker und Aminosäuren unter Beteiligung von Kreatin/Kreatinin miteinander reagieren (JAGERSTAD *et al.* 1991). Bisher sind etwa 20 verschiedene HAA identifiziert worden. PhIP und 2-Amino-3,8-dimethyl-6-phenylimidazo[4,5-*f*]chinoxalin (MeIQx) sind die HAA, die am häufigsten in erhitztem Fleisch und Fisch vorkommen. Für PhIP wird von einer durchschnittlichen Aufnahme von ca. 100-1000 ng/Tag/Person ausgegangen (LAYTON *et al.* 1995; BUTLER *et al.* 2003).

HAA werden meist als stabile Sulfo- oder Glucuronsäurekonjugate ausgeschieden. Die häufigsten Phase I-Metaboliten von PhIP sind die Hydroxide 4'-OH-PhIP und *N*-OH-PhIP (MALFATTI *et al.* 1999; KULP *et al.* 2000). Aber auch die Muttersubstanz selbst sowie 12 weitere Metaboliten wurden im Urin von Mäusen nach Verabreichung von PhIP nachgewiesen (CHEN *et al.* 2007). Die Konjugation des *N*-OH-PhIP durch

SULT oder NAT führt jedoch zu instabilen Metaboliten, die nach Abspaltung der Sulfat- bzw. Acetatgruppe mit DNA reagieren und somit genotoxisch wirken können (Abbildung 2).

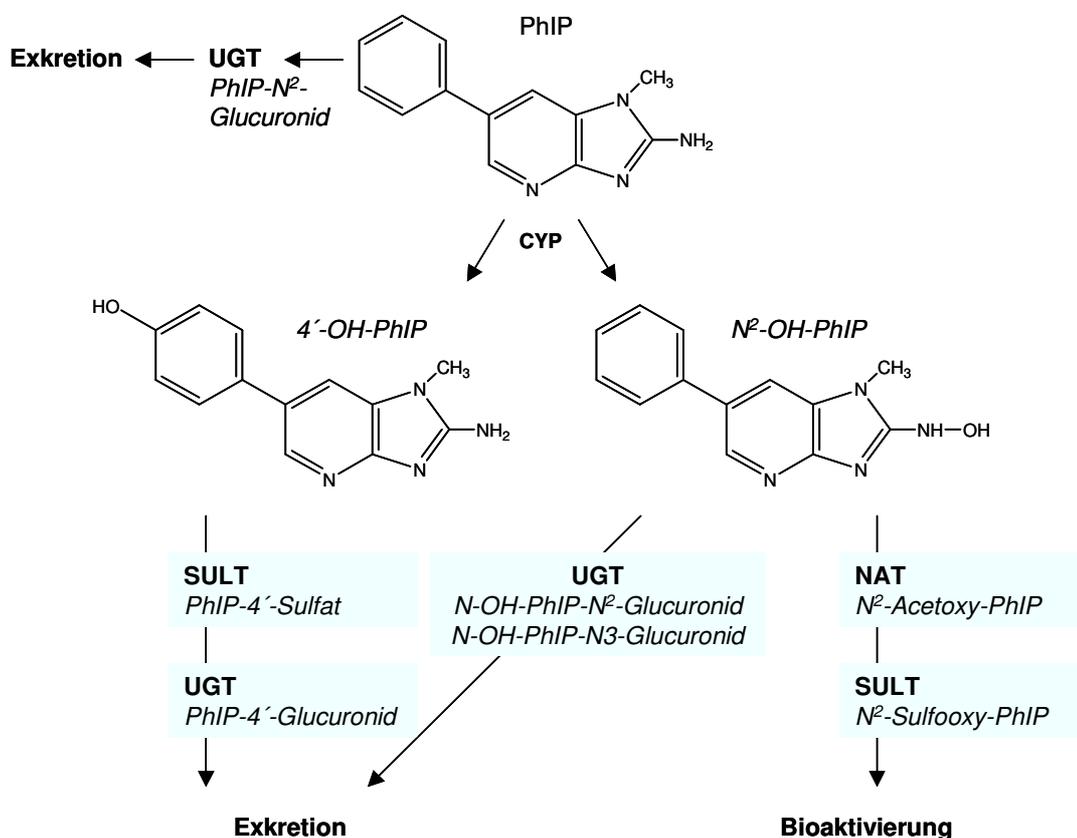


Abbildung 2: Grundzüge des PhIP-Metabolismus in Säugetieren. Die Hauptmetaboliten der CYP-vermittelten Hydroxylierung sind 4'-OH-PhIP und N²-OH-PhIP. Beide Phase I-Metaboliten, wie auch die Muttersubstanz, können nach Glucuronidierung ausgeschieden werden. Auch die Sulfonierung von 4'-OH-PhIP führt zur Exkretion, während Sulfonierung und Acetylierung von N²-OH-PhIP eine Bioaktivierung bewirken können. Die beteiligten Enzymfamilien sind fett gedruckt. CYP: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, SULT: Sulfotransferasen, UGT: UDP-Glucuronosyltransferasen, NAT: N-Acetyltransferasen. Die jeweils gebildeten Metaboliten sind kursiv gedruckt (modifiziert nach Hollnagel 2004).

In Kurzzeittests zeigten viele HAA eine stark mutagene Wirkung (FELTON *et al.* 1984). Das 1986 von Felton aus gebratenem Fleisch isolierte PhIP erwies sich als mutagen im Ames-Test und als stark genotoxisch und mutagen in CHO-Zellen (FELTON *et al.* 1986; THOMPSON *et al.* 1987). In Langzeit-Kanzerogenese-Versuchen in Nagern war PhIP, wie alle weiteren untersuchten HAA, kanzerogen (WAKABAYASHI *et al.* 1992; SUGIMURA 1997). Allerdings waren die meisten der untersuchten HAA primär Leber-Kanzerogene, wohingegen PhIP keine Lebertumoren, sondern in Ratten Kolon- und Mamma- (ITO *et al.* 1991) sowie Prostatumoren (SHIRAI *et al.* 1997) und in Mäusen Lymphome in Milz und Lymphknoten (ESUMI *et al.* 1989) sowie in C57BL/N6-Mäusen Adenokarzinome des Dünndarms (OCHIAI *et al.* 2002) auslöste. Auch konnte eine einmalige PhIP-Dosis von 200 mg/kg KG in Kombination mit Dextran-Natriumsulfat (eine Woche 2% im Trinkwasser) bei Mäusen innerhalb von 16 Wochen Neoplasien im Kolon verursachen (TANAKA *et al.* 2005). Damit erzeugt PhIP Tumore in drei Geweben, die zu denjenigen mit den höchsten Tumorinzidenzen der Menschen in Europa und den USA gehören (Kolon, Mamma und Prostata) und stellt eine der wenigen bekannten Substanzen dar, die im Kolon von Nagern Tumore induziert.

Es gibt Schätzungen, nach denen Bestandteile der Nahrung für annähernd ein Drittel der menschlichen Krebsfälle verantwortlich sind (DOLL und PETO 1981). Verschiedene epidemiologische Studien haben positive Korrelationen zwischen der Krebsinzidenz und dem Verzehr von stark gegartem Fleisch aufgezeigt (GERHARDSSON DE VERDIER *et al.* 1991; KAMPMAN *et al.* 1995; ZHENG *et al.* 1998; AUGUSTSSON *et al.* 1999). Eine Assoziation eines erhöhten Risikos für kolorektale Adenome mit dem Verzehr von stark gegartem Fleisch wurde von Sinha *et al.* festgestellt (SINHA *et al.* 1999; SINHA und ROTHMAN 1999). Folglich besteht der Verdacht, dass die Aufnahme von PhIP und weiteren HAA mit der Nahrung ein Faktor sein könnte, der mit der Entstehung von Kolon-, Brust- und Prostatakrebs beim Menschen in Verbindung steht.

1.1.3.2 1-HMP als Metabolit des PAK 1-MP

1-Methylpyren (1-MP) gehört zur Substanzklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). So werden Stoffe bezeichnet, deren Gemeinsamkeit in dem Vorhandensein von mindestens zwei kondensierten Benzolringen besteht. Die zahlreichen Molekülvarianten unterscheiden sich in der Anzahl der Benzolringe und im Vorkommen von Substituenten. PAK kommen in fossilen Brennstoffen und deren Destillationsprodukten vor und entstehen als Produkte unvollständiger Verbrennung organischen Materials beispielsweise in Kfz-Abgasen oder im Tabakrauch. Auch

Nahrungsmittel wie gebratene, gegrillte und geräucherte Lebensmittel und blättriges Gemüse können PAK enthalten. Die berufsbedingte PAK-Exposition ist eine nachgewiesene Ursache von Lungentumoren und weiteren Tumoren des Menschen (HARRIS *et al.* 1985; SILVERSTEIN *et al.* 1985; BONASSI *et al.* 1989; EVANOFF *et al.* 1993; PERERA *et al.* 1996; GRIMSRUD *et al.* 1998).

Als Prototyp der PAK gilt das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P). Für diese Substanz wurde die Metabolisierung zum vicinalen Dihydrodiolepidoxid als Aktivierungsweg zum ultimativen Kanzerogen identifiziert. Allerdings sind einige alkylierte PAK stärkere Kanzerogene als ihre nicht-alkylierten Strukturverwandten. Auch sie können, bei Vorliegen eines terminalen Benzo-Rings, zu vicinalen Dihydrodiolepidoxiden umgesetzt werden. Jedoch können alkylierte PAK auch über alternative Metabolismuswege, wie beispielsweise über die Bildung reaktiver Ester, aktiviert werden (DIPPLE *et al.* 1968; WATABE *et al.* 1982).

Zur Untersuchung dieser alternativen Aktivierungswege bietet sich das Umweltkanzerogen 1-MP an. 1-MP besitzt keinen terminalen Benzo-Ring (Abbildung 3), so dass keine Bildung von vicinalen Dihydrodiolepidoxiden wie beim B[*a*]P möglich ist. Die Methylgruppe hingegen erlaubt alternative Aktivierungsmechanismen wie die Bildung reaktiver benzyllischer Schwefelsäureester. Die hepatokanzerogene Wirkung des 1-MP wurde im Tierversuch an der neugeborenen Maus nachgewiesen (RICE *et al.* 1987), wohingegen das nicht methylierte Pyren keine kanzerogene Wirkung zeigte. 1-MP wurde in Zigarettenrauchkondensat und Autoabgasen (KUBOTA *et al.* 1975; YU und HITES 1981), aber auch in geräuchertem Käse (GUILLEN und SOPELANA 2004b) und als Verunreinigung in Olivenöl (GUILLEN und SOPELANA 2004a) nachgewiesen.

1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) ist der Hauptmetabolit des 1-MP (Abbildung 3). Es wird durch viele humane und Ratten-CYP-Formen gebildet (ENGST *et al.* 1999). Die Hauptmetaboliten des 1-HMP wiederum stellen 1-Pyrenylcarboxylsäure und deren Derivate dar, die etwa 80% der nach der i.p.-Applikation von 1-HMP von Ratten ausgeschiedenen Metaboliten ausmachen (MA 2002). Allerdings kann 1-HMP auch von verschiedenen Sulfotransferasen effektiv zu 1-Sulfoxymethylpyren (1-SMP) umgesetzt werden (LANDSIEDEL 1998). 1-SMP wiederum kann durch spontane Abspaltung der Sulfatgruppe zu einem Mutagen werden (GLATT 1997; GLATT *et al.* 1998).

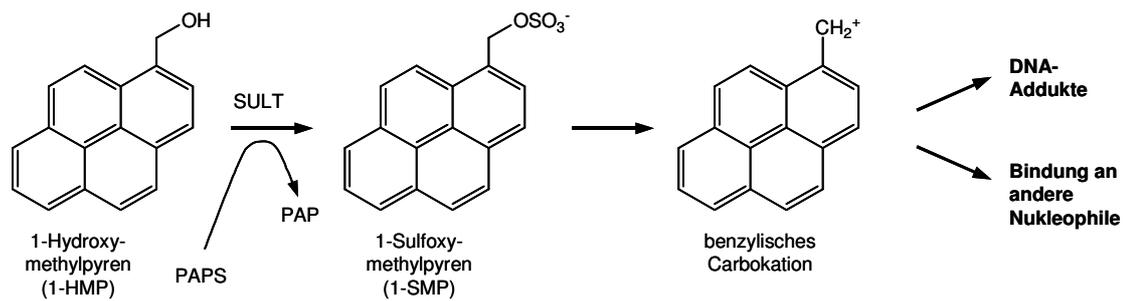


Abbildung 3: SULT-vermittelte Bioaktivierung von 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP). Durch Abspaltung der Sulfatgruppe entsteht ein mesomeriestabilisiertes Carbokation, das an DNA und andere Nucleophile binden kann. PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat, PAP: Phosphoadenosin-5'-phosphat, SULT: Sulfotransferase (modifiziert nach Ma 2001).

1.1.4 SULT1A-Formen

Mitglieder der SULT1A-Subfamilie sind in vielen verschiedenen Säugerspezies entdeckt worden, einschließlich Maus, Ratte, Kaninchen und Kuh (OZAWA *et al.* 1990; KONG *et al.* 1993; SCHAUSS *et al.* 1995; RILEY *et al.* 2002). In all diesen Spezies ist je eine einzelne Form charakterisiert worden, wohingegen im Menschen vier SULT1A-Subfamilienmitglieder identifiziert worden sind (HER *et al.* 1996; BLANCHARD *et al.* 2004; HILDEBRANDT *et al.* 2004). Die für diese Enzyme kodierenden Gene sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p12.1-11.2) lokalisiert und vermutlich durch Gen-duplikationen entstanden (HER *et al.* 1996; RAFTOGIANIS *et al.* 1996; RIKKE und ROY 1996; DOOLEY 1998). Die Aminosäuresequenzen von SULT1A1 und SULT1A2 sind zu 96% identisch und die Übereinstimmung aller Mitglieder der Subfamilie beträgt 91%. SULT1A3 katalysiert die Sulfonierung von Dopamin, anderen Katecholaminen sowie strukturell verwandten Arzneistoffen (WOOD *et al.* 1994; AKSOY und WEINSHILBOUM 1995; JONES *et al.* 1995). SULT1A4 ist ein erst kürzlich entdecktes Gen, das dieselbe Aminosäuresequenz wie SULT1A3 kodiert (HILDEBRANDT *et al.* 2004).

1.1.4.1 SULT1A1

Die cDNA der *hSULT1A1* wurde als erstes von Wilborn *et al.* aus einer Leberbibliothek isoliert (WILBORN *et al.* 1993). Sie kodiert für ein 295-Aminosäuren-Protein mit einer hohen Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat *p*-Nitrophenol. Die *hSULT1A1* wird am stärksten in der Leber (FALANY *et al.* 1990; OZAWA *et al.* 1998) sowie im Ileum und Dickdarm (TEUBNER *et al.* 2007) exprimiert. Das Protein wurde auch in zahlreichen

weiteren Geweben nachgewiesen (GLATT *et al.* 2001). Es hat ein apparentes Molekulargewicht von 32 kDa in der SDS-PAGE. Endogene Substrate der hSULT1A1 sind Iodothyronine (ANDERSON *et al.* 1995) und Östrogene (FALANY und FALANY 1997). Sie besitzt jedoch eine ausgesprochen breite Substrattoleranz und ist in der Lage, eine sehr große Anzahl an Promutagenen, wie beispielsweise *N*-OH-PhIP (MUCKEL *et al.* 2002) oder 1-HMP (GLATT 2003), zu aktivieren. Für das *hSULT1A1*-Gen wurden mehrere Polymorphismen identifiziert, deren häufigster ein Einzelnukleotidpolymorphismus an Position 638 ist. Es liegt eine Transition von G zu A vor, die zu einem Arg²¹³→His-Austausch in der Aminosäuresequenz führt und in Kaukasiern mit einer Allelfrequenz von etwa 30-35% beobachtet wurde (RAFTOGIANIS *et al.* 1997; OZAWA *et al.* 1998; COUGHTRIE *et al.* 1999; ENGELKE *et al.* 2000). Dieses Allel wird als *hSULT1A1*2* bezeichnet, während die häufigste Variante, die Referenzsequenz, als *hSULT1A1*1* bezeichnet wird.

1.1.4.2 SULT1A2

Das humane *SULT1A2*-Gen befindet sich in Kopf-zu-Schwanz-Orientierung zum *SULT1A1*-Gen 8,6 kb stromaufwärts auf Chromosom 16p11.2-12.1 (DOOLEY und HUANG 1996). Die cDNA der *hSULT1A2* wurde als erstes von Ozawa *et al.* (1995) kloniert. Das hSULT1A2-Protein hat ein geschätztes Molekulargewicht von 32,5 kDa in der SDS-PAGE. Auf mRNA-Ebene wurde die *hSULT1A2* in der Leber sowie, zum Teil in einer unvollständig gespleißten Form, in verschiedenen extrahepatischen Geweben detektiert (DOOLEY *et al.* 2000). Sie wird allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß als die hSULT1A1 exprimiert; eine schwache Proteinexpression konnte in Leber, Kolon, Caecum und Ileum nachgewiesen werden (MEINL *et al.* 2006; TEUBNER *et al.* 2007). Von Dooley (2000) wird die *hSULT1A2* als Genduplikation der *hSULT1A1* angesehen, die durch verschiedene Mutationen zu einem ineffektiven Quasi-Pseudogen wurde. Die hSULT1A2 ist in der Lage, verschiedene Promutagene zu aktivieren und ist die humane SULT-Form mit der höchsten Aktivierungseffizienz für *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren, einem starken Nager-Leberkanzerogen (HEFLICH und NEFT 1994; MEINL *et al.* 2002). Wie für die *hSULT1A1* sind auch für die *hSULT1A2* verschiedene polymorphe Varianten bekannt. Der häufigste Polymorphismus tritt bei Kaukasiern mit einer Frequenz von etwa 30-35% auf und besteht in zwei Basensubstitutionen (T²⁰→C und A⁷⁰⁶→C), die jeweils zu einem Aminosäureaustausch (Ile⁷→Thr und Asn²³⁵→Thr) führen. Die Referenzform wird als 1A2*1 und die zweithäufigste Form als 1A2*2 bezeichnet (RAFTOGIANIS *et al.* 1999).

1.1.5 SULT1B1

Das Gen der humanen SULT1B1 ist auf Chromosom 4q11-13 in einem Gencluster mit *SULT1E1* sowie dem Pseudogen *SULT1D1P* lokalisiert (MEINL und GLATT 2001). Die humane SULT1B1 wurde als erstes von Fujita *et al.* (1997) isoliert, die zeigen konnten, dass sie eine Thyroidhormon-Sulfotransferase mit einer höheren Affinität für Triiodthyronin als SULT1A1 ist. Das Enzym konjugiert aber auch andere Phenole (z.B. 4-Nitrophenol und 1-Naphtol) (WANG *et al.* 1998) und kann sehr effektiv bestimmte, von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen abgeleitete benzyliche Alkohole wie 6-Hydroxymethylbenzo[*a*]pyren und 4-Hydroxycyclopenta[*def*]chrysen (OH-CPC) aktivieren (GLATT 2000). Die hSULT1B1 hat ein geschätztes Molekulargewicht von 32,5 kDa in der SDS-PAGE. Beim Menschen liegt die höchste Expression der SULT1B1 im Ileum vor; sie wird jedoch im gesamten Gastrointestinaltrakt und mit geringerer Intensität in der Leber exprimiert (WANG *et al.* 1998; TEUBNER *et al.* 2007). Die Expression von SULT1B1-Formen wurde in verschiedenen weiteren Spezies wie Ratte, Maus und Hund gezeigt (SAKAKIBARA *et al.* 1995; SAEKI *et al.* 1998; TSOI *et al.* 2001).

1.2 Modellsysteme in der Toxikologie

Die Möglichkeit, epidemiologische Studien zur Untersuchung der human-toxischen Wirkung von Substanzen zu verwenden, ist begrenzt. Folglich sind für die Aufklärung toxikologischer Mechanismen Modellsysteme notwendig. Als Tiermodelle für den menschlichen Organismus werden häufig Ratten oder Mäuse eingesetzt. Damit die toxische Wirkung der Substanz klar ersichtlich wird, werden die Tiere meist mit erheblich höheren Dosen der zu untersuchenden Substanz behandelt, als denjenigen, denen der Mensch ausgesetzt ist. Bei der Interpretation der erhaltenen Daten hinsichtlich ihrer Humanrelevanz muss daher sowohl von der Tierspezies auf den Menschen als auch von einer hohen, regelmäßig verabreichten Dosis auf eine niedrige, unregelmäßige Exposition extrapoliert werden. Um die in Tierversuchen erhaltenen Daten besser interpretieren zu können, um herauszufinden, welche Toxizitätsmechanismen eine Rolle spielen und um Substanzen vor Einsatz in einem Tierversuch in ihrer Wirkung einschätzen zu können, werden daher zahlreiche *in vitro*-Modellsysteme verwendet.

1.2.1 Modellsysteme für fremdstoffmetabolisierende Enzyme

In vitro-Mutagenitätstests in Bakterien und kultivierten Säugerzellen sind die wichtigsten Modellsysteme zur Detektion von Mutagenen bzw. Kanzerogenen und zur Aufklärung ihrer Aktivierungswege. Da in den Zielzellen der Standardsysteme die meisten bioaktivierenden Enzyme nicht exprimiert werden, muss entweder das ultimale Mutagen direkt im Test verwendet werden, oder es muss aus seinen metabolischen Vorläufern *in situ* durch ein passendes externes Metabolisierungssystem generiert werden. Falls allerdings das ultimale Mutagen zu kurzlebig oder nicht membrangängig genug ist, um vom externen Metabolisierungssystem in das Zellinnere zu gelangen (GLATT *et al.* 1990), kann die mutagene Wirkung einer solcherart aktivierten Substanz übersehen werden (SMITH *et al.* 1986). Um dies zu vermeiden, werden die hinsichtlich ihrer Aktivierungskapazität zu untersuchenden Enzyme heterolog in den Zielzellen exprimiert (GLATT *et al.* 1998). Zur Aufklärung der metabolischen Aktivierung durch Sulfotransferasen wurden in der Abteilung ETOX des DIfE humane SULT in Zellen sowohl bakterieller als auch eukaryotischer Zelllinien zur Expression gebracht und diese in Mutagenitätstests eingesetzt (sogenannte „humanisierte Testsysteme“). Auch SULT-Formen weiterer Spezies (z.B. Maus, Ratte und Hund) wurden in diesen Testsystemen exprimiert. Auf diese Weise konnte bisher für mehr als 100 Substanzen ihre SULT-vermittelte Aktivierung zu Mutagenen nachgewiesen werden (GLATT 2000). Dazu gehören hitzeinduzierte Nahrungsbestandteile (HAA, 5-Hydroxymethylfurfural), Arzneistoffe (Oxamniquin, Cyproteronacetat), pflanzliche Metaboliten (Safrol, Aristolochiasäure) sowie Industriechemikalien (2-Nitropropan, Nitro- und Aminoarene).

Bei Substanzen, die *in vitro* eine mutagene Wirkung zeigen, kann mit gewisser Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sie auch *in vivo* ein mutagenes oder kanzerogenes Potential besitzen. Um dieses Potential beurteilen zu können, werden Tierversuche durchgeführt, in denen die betreffende Substanz hinsichtlich ihrer Aufnahme und Verteilung im Organismus, ihrer Wirkung auf den Organismus, ihrer Metabolisierung und ihrer Eliminierung untersucht wird. Wenn jedoch im *in vitro*-Mutagenitätstest ein humanes Enzym als Auslöser einer Substanzaktivierung identifiziert wurde, besteht die Unsicherheit, ob die orthologe Enzymform der im anschließenden Tierversuch eingesetzten Tierspezies in der Lage ist, den aktiven Metaboliten mit gleicher Effizienz zu bilden wie die *in vitro* untersuchte Humanform. Beispielsweise wirkt *N*-OH-PhIP im Ames-Test mit einem mSult1a1-exprimierenden *Salmonella typhimurium*-Stamm nicht mutagen, während es von der humanen SULT1A1-Form sehr effektiv aktiviert wird (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Des Weiteren können sich die

Gewebeverteilung, das Expressionsniveau oder die Induzierbarkeit orthologer Enzyme in unterschiedlichen Spezies unterscheiden. So wird die SULT1B1 im humanen Kolon deutlich stärker exprimiert als die mSult1b1 im Kolon der Maus (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch Behandlung primärer Hepatozyten der Ratte mit dem Glucocorticoid Dexamethason ließ sich die Expression der rSult1a1 induzieren, was für die hSULT1A1 im entsprechenden Versuch nicht der Fall war (DUANMU *et al.* 2002). Auch kann es vorkommen, dass für bestimmte Enzyme des Menschen in den Labortierspezies gar kein orthologes Gegenstück existiert.

Um trotz solcher Speziesunterschiede einzelne humane Enzyme auf der Ebene des Gesamtorganismus in ihrer Wirkung untersuchen zu können, besteht die Möglichkeit, Tiermodelle mit gentechnischen Methoden dem Menschen anzugleichen. Sogenannte „humanisierte“ transgene Tiermodelle können, analog zu den humanisierten *in vitro*-Testsystemen, die Wirkung eines humanen Enzyms darstellen, sie jedoch dabei in das physiologische Zusammenspiel eines komplexen Modellorganismus integrieren.

1.2.2 Transgene Tiermodelle

Seit der Erzeugung der ersten transgenen Mauslinien im Jahr 1982 (PALMITER *et al.* 1982) hat sich die Generierung von Säugermutanten zu einer weit verbreiteten Technologie entwickelt, die sich verschiedener methodischer Ansätze bedient. Es können sowohl Fremd-Gene in ein Genom eingeschleust und (über-)exprimiert (heterologer Gentransfer, gain of function), als auch eigene Gene des Organismus gezielt ausgeschaltet (knock-out-Technologie, loss of function), verändert oder herabreguliert werden.

Palmiter *et al.* (1982) hatten durch das Einfügen eines Wachstumshormon-Gens aus der Ratte in die Keimbahn der Maus in den transgenen Mäusen eine im Vergleich zum Wildtypstamm erhebliche Größenzunahme erzielt. Die dafür verwendete Technik der Mikroinjektion (Abbildung 4) wird auch heute noch häufig zur Erzeugung transgener Tiere verwendet. Zur Herstellung solcher transgener Tiere wird ein DNA-Konstrukt 12 Stunden nach der Kopulation in einen der Vorkerne der Zygote mikroinjiziert. Dabei werden eine oder mehrere Kopien des Konstrukts an nicht vorhersehbarer Stelle in das Genom des Spenderorganismus integriert und bei allen folgenden Zellteilungen weitergegeben. Die verwendeten DNA-Konstrukte können sowohl aus cDNA als auch aus genomischer DNA erstellt werden. Die manipulierten Zygoten werden in ein

scheinträchtiges Ammentier übertragen und von diesem ausgetragen. Die Nachkommen werden auf Transgenität untersucht und begründen, falls diese vorliegt, als sogenannte „Founder-Tiere“ eine transgene Linie, für die eine Zucht aufgebaut wird. Die Technologie der Mikroinjektion führt im Allgemeinen zu einem „Gain of Function“, jedoch kann daraus, wenn man ein Konstrukt injiziert, das eine sogenannte „small interference RNA“ (siRNA) kodiert, auch ein Gen-Knock-Down durch die RNA-Interferenz resultieren (HASUWA *et al.* 2002).

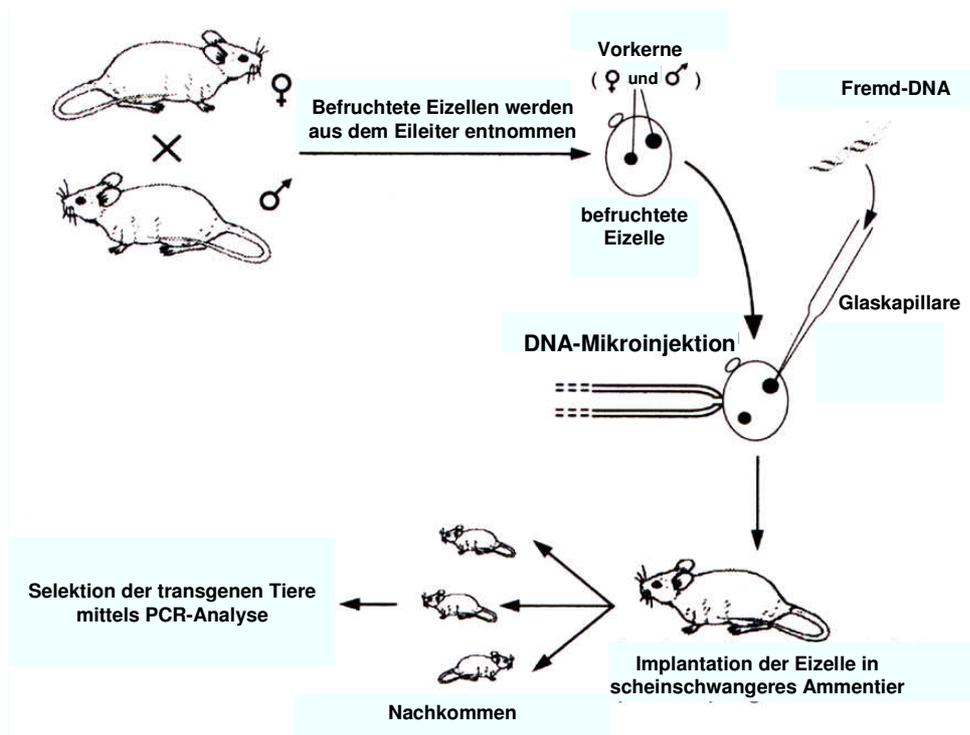


Abbildung 4: Pronukleus-Injektion als Technik zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie. Die Fremd-DNA wird in den männlichen Vorkern einer befruchteten Maus-Oozyte injiziert. Die manipulierte Oozyte wird einem scheinchwangeren Ammentier implantiert und die resultierenden Nachkommen auf Transgenität getestet. Abbildung aus: Gassen (1996).

Eine grundsätzlich andere Technik zur Erzeugung transgener Tiere ist die homologe Rekombination bzw. das „Gene Targeting“. Dazu werden embryonale Stammzellen mit einem Targeting-Vektor transfiziert, wodurch ein bekanntes Gen des Zielorganismus verändert werden kann. Für einen „loss of function“ werden Knock-Out-Mutanten erzeugt, während bei Knock-In-Mutanten definierte DNA-Sequenzen gezielt eingefügt oder verändert werden. Stammzellklone, bei denen eine homologe Rekombi-

nation erfolgte, werden in Blastozysten einer Mauslinie anderen Wildtyps injiziert. Aus diesen Blastozysten gehen Nachkommen hervor, deren Zellen zum Teil auf die homolog rekombinierten Stammzellen zurückzuführen sind. Falls die Veränderung auch in der Keimbahn manifestiert ist, wird die genetische Veränderung an die Nachkommen weitergegeben. Für eine konditionale Mutagenese wird häufig das bakterielle Rekombinationssystem *Cre/loxP* genutzt. Dabei wird das Ziel-Gen durch homologe Rekombination mit *loxP*-Sequenzen (*locus of cross-over* Bakteriophage P1) flankiert, wodurch man sogenannte „floxed mice“ erhält. Eine zweite transgene Mauslinie, in der das *Cre*-Gen (Causes Recombination) des Phagen P1 unter Kontrolle eines Promotors, der im Zielgewebe aktiv ist, exprimiert wird, wird mit den „floxed mice“ verkreuzt. Da *Cre* die Rekombination an den beiden *loxP*-Seiten katalysiert, wird das flankierte Ziel-Gen eliminiert. Bei Tieren, in denen das „floxed gene“ homozygot vorliegt, wird das Ziel-Gen in den *Cre*-exprimierenden Zellen inaktiviert (NAGY *et al.* 2003).

Transgene Tiere dienen als Modellsysteme, die bei der Untersuchung einer Vielzahl von unterschiedlichen Fragestellungen zum Einsatz kommen. Sie werden verwendet, um Stufen der Genregulation und die dabei ablaufenden Signalkaskaden im kompletten Organismus untersuchen zu können (SCHENKEL 2004). Sie kommen bei der Untersuchung von entwicklungsbiologischen Prozessen (GOSSLER *et al.* 1989) und (patho-)physiologischen Mechanismen (BADER *et al.* 2000; HAASE *et al.* 2006) zum Einsatz. Auch eine produktive Nutzung der Transgen-Techniken findet statt, indem beispielsweise in transgenen Tieren die Herstellung großer Mengen von Fremdproteinen erfolgt, die anderweitig nur schwer zu gewinnen wären, z.B. wegen komplizierter posttranskriptioneller Modifikationen (NIEMANN *et al.* 1999). Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet ist die Verwendung transgener Tiere als Testsystem. Durch Mutationen können Tiere so verändert werden, dass sie deutlich empfindlicher auf gewisse Stimuli reagieren als der Wildtypstamm. So reagieren beispielsweise Tiere mit einem heterozygoten Knock-Out eines Tumor-Supressor-Gens (z.B. die TSG-p53⁰ heterozygote Knock-out Maus) oder Tiere, die hemizygot ein humanes Onkogen exprimieren (z.B. die transgene rasH2-Maus (WATANABE *et al.* 2002)), auf Kanzerogene mit einer erheblich früheren Tumorbildung als genetisch unveränderte Tiere. Sie können daher genutzt werden, um in deutlich kürzerer Zeit das kanzerogene Potential einer Substanz im Tiermodell zu untersuchen.

1.3 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten transgene Mauslinien für den Gen-Cluster der humanen Sulfotransferasen *hSULT1A1* und *hSULT1A2* sowie für das *hSULT1B1*-Gen erzeugt werden, um ein Tiermodell zu etablieren, in dem eine mögliche Beteiligung von Sulfotransferasen bei der Entstehung von Krebs beim Menschen untersucht werden kann.

In vielen Publikationen der Abteilung ETOX des DfE wurde *in vitro*-Testsystemen gezeigt, dass Sulfotransferasen verschiedene, vom Menschen über Nahrung oder Atemluft aufgenommene Substanzen zu Mutagenen aktivieren. Für Untersuchungen auf der Ebene des Gesamtorganismus stellen konventionelle (genetisch unveränderte) Nager wegen der großen Unterschiede zwischen den orthologen SULT-Formen in Bezug auf deren Substratspezifität sowie Gewebeverteilung bei Mensch und Nagern kein hinreichendes Modellsystem dar.

Um das Mausmodell sowohl hinsichtlich der Substratspezifität als auch hinsichtlich der Expressionsverteilung dem Menschen entsprechend zu gestalten, mussten die humanen Gene solcherart in die Mäuse überführt werden, dass ihre Transkriptionsregulation analog zum Menschen erfolgen kann. Die zu diesem Zweck verfolgte Strategie war, die humanen Gene durch Pronukleus-Injektion von großen DNA-Konstrukten ins Mausgenom zu überführen. Diese Konstrukte umfassten neben den kompletten humanen Genen große Bereiche der flankierenden Sequenzen. Dies sollte sicherstellen, dass möglichst viele (im Idealfall alle) putativen *cis*-regulatorischen Sequenzabschnitte, die beim Menschen die Gewebeverteilung der SULT-Expression steuern, mit in diesen Konstrukten enthalten sind. Damit sollte, bei Vorliegen aller erforderlichen Transkriptionsfaktoren, in der transgenen Maus eine Transkriptionsregulation wie beim Menschen erfolgen.

Nach dem molekularbiologischen Nachweis, dass die DNA-Konstrukte an die Nachkommen weiter gegeben wurden, d. h. eine transgene Linie aufgebaut worden war, sollten das Expressionsniveau, die zelluläre und subzelluläre Expressionsverteilung und die Enzymaktivität der jeweiligen Transgene untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob das Einbringen der genomischen DNA-Konstrukte tatsächlich die angestrebte, dem Menschen entsprechende zelluläre und Gewebeverteilung der Expression der humanen Proteine in den transgenen Mäusen bewirkt. Des Weiteren sollten Kenntnisse über die erzeugten Linien bezüglich der Kopienzahl des Transgens, seines chromosomalen Integrationsorts und, wenn möglich, der genauen

genomischen Lokalisation der Transgen-Integration gewonnen werden. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass im Tierexperimenten ermittelte Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen als Resultat der Transgen-Expression bewertet werden können.

Die transgenen Linien sollten in toxikologischen Versuchen eingesetzt werden, falls die biochemische und molekularbiologische Charakterisierung zeigt, dass es sich bei ihnen um geeignete Modellsysteme für die humane SULT-Expression und -Verteilung handelt. Von besonderem Interesse war die Untersuchung des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP und des Metaboliten 1-HMP des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs 1-MP. Der Mensch ist gegenüber diesen Fremdstoffen durch Nahrungsmittel- bzw. Umweltkontaminationen exponiert und für beide Verbindungen war aus *in vitro*-Mutagenitätstest bekannt, dass sie von der hSULT1A1 effektiv aktiviert werden können. Daher sollte in einer der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien vergleichend zum Wildtyp untersucht werden, wie die Expression der humanen SULT1A1 die genotoxische Wirkung von PhIP und 1-HMP in verschiedenen Geweben der Mäuse beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

DNA-Konzentrationsbestimmung, Elektro-Transformation, PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Thermocycler T Gradient und T3	Biometra, Göttingen
Agarosegelelektrophorese-Apparatur Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Netzgerät Minicell Power Pack P20,	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer ND-1000	peqlab-Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV-Detektion Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
Gel Doc System	Bio-Rad, München
Mx3005P Quantitative PCR System	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> Pulser Transformationsapparat	Bio-Rad, München

Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot

Mikrotiterplattenreader	SLT, Crailsheim
Elektrophorese Power Supply EPS 600	Amersham Biosciences, Freiburg
Multiphor II Nova Blot Electrophoretic Unit	Amersham Biosciences, Freiburg
Gießapparatur	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybridisierungssofen OV2	Biometra, Göttingen
Luminescent Image Analyser LAS 100	Fuji, Düsseldorf
SDS-PAGE-Apparatur Hoefer SE 600 Series	Amersham Biosciences, Freiburg

Immunhistochemie

Rotationsmikrotom HM 350	Microm, Heidelberg
Paraffinausgießstation Histocentre 2	Shandon, Frankfurt am Main
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Shandon, Frankfurt am Main
Färbeautomat Varistain XY	Shandon, Frankfurt am Main
Mikroskop Eclipse E1000	Nikon, Düsseldorf

Homogenisatoren

Ultra Thurax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Potter-Elvehjem-Homogenisator	MWL Mechanik Prüfgeräte, Medingen

³²P-Postlabelling

Rotationsschüttler Heidolph REAX2	Heidolph, Kehlheim
Instant Imager	Canberra Packard, Meriden, USA
DC Kammern, 20x10x20 cm, Glas	Desaga, Heidelberg
Vakuumkonzentrator CS 110 Speed Vac	Savant Instruments, Holbrook, USA
Kühlfalle RVT 100 und Pumpe RS15	Brand, Wertheim
Fujix-Bas 2000 Imaging Analyser	Fuji Photo Film, Tokio, Japan

Zentrifugen

Mikrozentrifuge 100 VAC	Roth, Taiwan
Biofuge Fresco	Heraeus Instrument GmbH, Berlin
Eppendorf Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Sigma Zentrifuge 4K10	Braun Biotech International, Melsungen
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Beckmann Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

2.1.2 Chemikalien

Falls nicht gesondert angemerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg).

RPMI 1640 W/Hepes W/Glutamax-I, Colzemid, SYBR Green (10 000x in DMSO)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin, Kanamycin, Ampicillin, Chloramphenicol, Ethidiumbromid, Heparin-Natrium, Phytohämagglutinin PHA-M, LPS von <i>E. coli</i> , SOC-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Szintillationscocktail Rotiszint eco plus, Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 30% (w/v), TEMED Fertiglösung, Tween20, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1/24/1)	Roth, Karlsruhe

PAP ³⁵ S	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
PhIP-HCl, >99%	Nard Institut, Amagasaki, Japan
EnVision ⁺ HRP-Labelled Polymer	Dako, Hamburg
1-HMP, 1-SMP	Herr Dr. A. Seidel, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
PAPS, PhIP- und MP-adduktierte Heringsperma-DNA	ETOX, DfE, Nuthetal
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Complete Protease-Inhibitoren-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
50 x dNTP-Mastermix (12,5mM/dNTP)	Invitak ,Berlin
Antikörperverdünnungsmedium	Dako, Hamburg
γ - ³² P-ATP, >7000 μ Ci/mmol	Hartmann Analytik, Braunschweig

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alle nicht gesondert erwähnten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth, Nunc und Eppendorf bezogen.

Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, heparinisiert	Brand, Wertheim
F96 Microwell Platten, transparentes Polystyrol	Nunc, Wiesbaden
Nunclon Zellkulturröhrchen mit Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Gene Pulser Cuvetten	Bio-Rad, München
Elektroden-Papier NOVABLOT	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Hybond TM ECL TM	Amersham Biosciences, Freiburg
Nitrocellulosemembran	
DAKO-Pen	Dako, Hamburg
Phase-Lock-Gel-Gefäße, 15 ml	Eppendorf, Hamburg
Whatman Chromatographie-Papier 46 x 47 cm	Schleicher & Schüll, Dassel
Polypropylen-Platten 96-WL Tubes	Stratagene, La Jolla, USA
Mx3000P optical strip caps	Stratagene, La Jolla, USA
Histofluid	Marienfild GmbH, Lauda-Königshofen
Szintillationsgefäße Minivials B	Roth, Karlsruhe
PEI-TLC-Platten Polygram CEL 300 20x20 cm, Batch 06/04	Machery-Nagel, Düren

2.1.4 Lösungen

Agarose-Gele	0,5-4% (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit 0,004% (w/v) Ethidiumbromid
Anodenpuffer I	300 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
APS-Lösung	2% APS (w/v) in H ₂ O
Blockierungslösung	1% (w/v) BSA, in TBS-T pH 9,0
Eosin	1% Eosin in H ₂ O
Fließmittel D1	1 M Natriumdihydrogenphosphat, pH 6,0
Fließmittel D3	3,5 M Lithiumformiat, 8,5 M Harnstoff, pH 3,5
Fließmittel D4	0,8 M Lithiumchlorid, 0,5 M Tris, 8,5 M Harnstoff, pH 8,0
Fließmittel D4+	1 M Ammoniumhydroxid
Fließmittel NN	0,3 M Ammoniumsulfat, 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
Gentamycin-Medium	10 mg/ml Gentamycin in RPMI 1640-Medium
Heparinlösung	500 U/ml Heparin-Natrium in Gentamycin-Medium
Kathodenpuffer	40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 200 ml Methanol, 0,1 g SDS ad 1 l H ₂ O
Kinase-Puffer	200 mM Bicine, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 10 mM Spermidin, pH 9,0
Kaliumchlorid-Phosphat-Puffer	150 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
LPS-Lösung	750 mg/ml LPS in Gentamycin-Medium
Mayers Hämalun	1 g Mayers Hämatoxilin in 1 l H ₂ O lösen, 200 mg Natriumiodat und 50 mg Kaliumalaun zugeben und lösen, 50 mg Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure hinzufügen
Mukosa-Puffer	1 Tablette Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, 50 ml KCP
Natrium-Citrat-Puffer	0,15 mM Na-Citrat, 1,5 mM NaCl, pH 7,5
Natrium-Succinat-Puffer	100 mM Na-Succinat, 50 mM CaCl ₂ , pH 6,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
PBS/T	0,2% (v/v) Tween20 in PBS
PHA-M-Lösung	112 μ g/ml PHA-M in Gentamycin-Medium
Probenpuffer	50% Glycerin in 10 mM Tris-HCl, Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 ml Probenpuffer
Sammelgel (3%)	für zwei Gele: 12,7 ml H ₂ O, 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 5 ml Sammelgelpuffer, 0,3 ml APS-Lösung (20 mg/ml), 20 μ l TEMED
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS

SOC-Medium:	2,0% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
Solubilisierungspuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) Mercaptoethanol und 0,1 % (w/v) Bromphenolblau)
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl, 100 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6,7; 2% (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCH ₃ COO, 1 mM EDTA, pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
Trenngel (11%)	für zwei Gele: 22 ml H ₂ O, 22 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 15 ml Trenngelpuffer, 0,9 ml APS-Lösung (20 mg/ml), 20 µl TEMED
Trenngelpuffer	2,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
TBS-T pH 9,0	140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) Tween20

2.1.5 Enzyme

Micrococcus-Nuklease aus <i>S. aureus</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphodiesterase II aus Kalbsmilz	Calbiochem, Schwalbach
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Roth, Karlsruhe
RNase A aus bovinem Pankreas	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	Fermentas, St. Leon-Rot
Go-Taq Polymerase (5 U/µl)	Promega, Mannheim
Roboklon-Taq Polymerase (5 U/µl)	Roboklon, Berlin
Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech, Mountain View, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main, Fermentas, St. Leon-Rot
ImmoMix für Hot Start PCR	Bioline, Luckenwalde
Quick T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt am Main

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper:

Antiserum A	M.W. Coughtrie, University of Dundee, UK, ("anti-MPST")
Antiserum B	M.W. Coughtrie, University of Dundee, UK, ("antiP-PST-Peptid")
Antiserum C	C.E. Engelke, DIfE, Nuthetal, („Selma“)
Antiserum 1B1s	M.W. Coughtrie, University of Dundee, UK
Antiserum 1B2r	C.N. Falany, University of Alabama, USA

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen-IgG-Peroxi- dase-Konjugat aus Ziege	Sigma, Deisenhofen
Anti-Schaf-IgG-Peroxi- dase-Konjugat aus Esel	Sigma, Deisenhofen
EnVision, HRP rabbit	Dako, Hamburg

2.1.7 DNA-Leitern

λ -DNA <i>EcoRI</i> x <i>HindIII</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Reaktionskits

QIAGEN Large-Construct Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen Hilden
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Genomic DNA Isolation Kit Tissue & Cells	nexttec, Leverkusen
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Karlsruhe
GeneJET PCR cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Western Blotting Detection Kit	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Genome Walker Universal Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
BCA Protein Assay	Pierce, Rockfort, USA
Sky-Paint-Kit-DNA-M10	Applied Spectral Imaging, Neckarhausen

2.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma BioTez, Berlin synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T7	TAATACGACTCACTATAGG
1A1Pac3end_F	CACTTAATCAACTGCGAACCTCTCGCCATG
1A1Pac3end_R	TCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
1A1In4R	GCTCTCAAACCTCCCAACCTCAGGTGATCTG
1A2In4R	GGTGAGGTCTCGGCTGACTACAACCTCTG
Hast23NcoS	GAGCTCAGGACCATGGAGCTGATC

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
h1B1-9000 F	ACGCACACACACATGCCAGAAGTCTGTCTG
h1B1-9000 R	GCTTGACCAACCTTGGGTTAGAGGCCCAAC
1B1ln1F	TAGATCTCCATGTGCGCAGAATGTTAAAGG
1B1ln3R	AATCTACTCCGGTTTTAGTGAAAGTCACAC
1B1ln3F	CTTTTGGAGATGGAGAAAGTGAAGTACAGAG
1B1ln4R	ACAGAAGGCCTGAAGATCTAGGGAGAGTTG
1B1ln4F	TGGTCTATTAATGCTTCACAGTGTCAAGTG
1B1ln6R	GAAGAAAGAGTGGTCAGATATAACGCAGTG
1B1ln6F	TTCTGATCTTATTCTTCTGTCAGAGAGGAC
1B1ln7R	ATTTTGAATCTCAGCAACTTTTTGGTGGTAG
1B1ln7F	ATGCCTGACTATTGATCCAAGTGCTCAGTG
1B1 3'UTR_R	TTGATTGCCCAATCAATTCATAACTGCCCTCGTTTC
nPACrep fw	CCCTCTATCGCACATCTTAGACTT
nPACrep rev	CATAGCATTCTCTGCATGCTTACT
glob-sal fw	GGGACATGTGCGACTTTGTGCATAGACAATAGCAG
glob-sal rev	TGGGCCATGTGCGACCCTGTGTAGATATGGTTG
mhBGlob fwII	AAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATC
mhBGlob revII	CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTGAGGCCATC
RT_2_F	GACTACAGGCCCTCATCATCC
RT_3_R	CCCATTGAGGAACTGAGCTGCTAC
RT_template_F	CACCCACAATCAGCCACTGC
RT_template_R	CAGGACAAACACGGCCATT
SWalk2	CGTTGATTGATCGAATTGAGGCACTTG
SWalk3	GCAGCATATCATGGCGTGTAATATGAGAG
SWalk4	AGTCGCTCCTCCTGCCAGAAGTGCAGTC
SWalk5	GATGTTTCATGTTTCATGTCTCCTTCTGTATG
SWalk6	CTGTTTTTTCGATCTGCCGTTTCGATCCTC
AWalk4	ATCACTTGCAGCCAGGGGTCCAGACGAGCC
ALok4	AGCAAAGACATCTAGTTCAATGG
ALokV4	GAAAGCTACAGTAATCAAGATGTTGTAAGC
BWalk4	TGTGCAAAAATCACAAGCATTCTTATACACCAATAACAC

2.1.10 PAC-Konstrukte

RPCI-Klone in <i>E. coli</i> Stamm DH10B	vom MPI für Molekulare Genetik, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt
Klon 704J18921Q2	
Klon 704B06659Q2	
Klon 709O23161Q2	
Klon 704J11868Q2	
Klon 704789L15	

2.1.11 Biologische Materialien

Humane Gewebeproben	Von der Abteilung ETOX des DfE (Nuthetal) freundlicherweise zur Verfügung gestellt
Sulfotransferase-Proteinstandards (Bakterienzytosole)	Von der Abteilung ETOX des DfE (Nuthetal) freundlicherweise zur Verfügung gestellt

2.1.12 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	Stratagene, La Jolla, USA
-----------------------------------	---------------------------

2.1.13 Software

AIDA/2D Densitometry Software	Raytest GmbH, Straubenhardt
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	NCBI, Bethesda, USA
MxPro QPCR Software Version 3.00b	Stratagene, La Jolla, USA
Quantity One 1-D Analysis Software Version 4.6	Bio-Rad, München
Vector NTI Suite 9	Invitrogen, Karlsruhe
Mann-Whitney Rangnummern-Test	http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Falls nicht gesondert angemerkt wurden die gängigen molekularbiologischen Methoden - wie Restriktionsverdau von DNA, Ligation, (Elektro-)Transformation und Kultivierung von *E. coli* und die Herstellung (elektro-)kompetenter Bakterien ent-

sprechend den Protokollen aus Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Isolierung und Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten, Plasmid-DNA, PAC-Konstrukten und genomischer DNA wurde mit den jeweiligen Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Sämtliche weiteren eingesetzten Kits wurden ebenfalls, sofern nicht gesondert ange-merkt, entsprechend den Herstellerangaben verwendet. DNA-Sequenzierungen wurden von AGOWA (Berlin) durchgeführt.

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Geweben für das ³²P-Postlabelling

Die bei 4°C in 10 mM EDTA (pH 8) homogenisierten Gewebe wurden durch ein-stündige Inkubation bei 37°C in 3% SDS und 0,6 mg/ml Proteinase K aufgeschlossen. Die DNA-Isolierung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion in Phase-Lock-Gel-Gefäßen entsprechend den Herstellerangaben. Zum Fällern der DNA wurden 0,1 Vol 3 M Na-Acetat und 1,5 Vol eiskaltes 2-Ethoxyethanol verwendet. Nach Waschen mit 70%igem eiskaltem Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 300-500 µl Na-Citrat-puffer aufgenommen.

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen

Zur Isolierung der DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse wurde das „Geno-mic DNA Isolation Kit“ für Gewebe und Zellen der Firma Nexxtec entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.3 DNA-Isolierung durch Aussalzen

Zur Erstellung der Genombibliotheken für das „Genome Walking“ wurde genomische DNA aus murinem Lebergewebe isoliert. Der Aufschluss des Leberhomo-genats erfolgte bei 55°C entsprechend den in Abschnitt 2.2.1.1 genannten Bedingun-gen. Durch Zugabe von 50 Vol.-% 5 M NaCl-Lösung wurden die Proteine ausgefällt. Im Überstand wurden durch Inkubation mit 60 µg/ml RNase A (15 min, 37°C, schüttelnd) die Ribonukleinsäuren zerstört. Mit 50 Vol.-% Isopropanol wurden die Nukleinsäuren ausgefällt, durch Zentrifugation (20 min, 15.800 x g, 4°C) pelletiert und nach Waschen mit 70% eiskaltem Ethanol getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.4 Präparation von PAC- und Plasmid-DNA

Die Präparation von PAC- und Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Large Construct Kits bzw. des Qiaprep Spin Miniprep Kits entsprechend den Protokollen der Herstellerfirma.

2.2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch mit den Spektralphotometern Gene Quant II bzw. ND-1000 bestimmt.

2.2.1.6 Erzeugung der transgenen Mauslinien

Die transgenen Mauslinien wurden am MPI für Molekulare Genetik (Berlin) von Herrn I. Voigt den Standardvorschriften entsprechend generiert (NAGY *et al.* 2003). Die Konstrukte zur Erzeugung der transgenen Mäuse wurden durch *SaII*-Verdau linearisiert. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1-2 µg/ml in DNA-Mikroinjektionspuffer verdünnt. Anschließend wurde sie in männliche Vorkerne befruchteter Eizellen von FVB/N-Mäusen injiziert. Zygoten, die sich im Zwei-Zell-Stadium befanden, wurden in Ovidukte pseudoschwangerer weiblicher FVB/N-Mäuse retransferiert. Transgene Mäuse wurden mittels PCR auf genomischer DNA von Schwanz-Biopsien identifiziert. Hierfür wurden die Mäuse nach dem Absetzen von der Mutter durch Ohrlochung markiert, ein 1-3 mm langes Stück des Schwanzes abgeschnitten und die DNA isoliert (Abschnitt 2.2.1.2). Die PCR wurde entsprechend Abschnitt 2.2.1.8 durchgeführt.

2.2.1.7 Zucht der transgenen Mauslinien zur Homozygotie

2.2.1.7.1 Identifikation homozygot transgener Mäuse durch Echtzeit-PCR

Zur Zucht der transgenen Mauslinien zur Homozygotie wurden 10 Wochen alte hemizygot transgene Mäuse verpaart und die Nachkommen mittels PCR auf das Vorliegen von Transgenität untersucht. Die DNA der als transgen identifizierten Tiere wurde in der Echtzeit-PCR (Abschnitt 2.2.1.9) eingesetzt. Als Kontrolle diente die DNA von Tieren, deren Zygote-Status durch FISH (Abschnitt 2.2.1.12) oder Rückkreuzen (Abschnitt 2.2.1.7.2) ermittelt worden war. Für jede Probe wurde der Quotient (relative Kopienzahl des Transgens) aus der ermittelten Kopienzahl des Transgens und der Kopienzahl des endogenen Maus- β -Globin-Gens gebildet. Er ist bei homozygot transgenen Tieren doppelt so hoch wie bei hemizygot transgenen Tieren derselben Linie.

2.2.1.7.2 Identifikation homozygot transgener Mäuse durch Rückkreuzen

Zur Identifikation homozygot transgener Mäuse unter den transgenen Nachkommen zweier hemizygot transgener Mäuse wurden diese Nachkommen mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Waren bei Wurfgrößen von 10-13 Tieren alle Nachkommen aus der Verpaarung transgen, so konnte davon ausgegangen werden, dass das untersuchte Elterntier für das Transgen homozygot ist.

2.2.1.8 PCR-Experimente

PCR-Experimente wurden in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Nach fünfminütigem Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs bei 94°C erfolgten 30-40 Amplifikationszyklen bestehend aus 40 s Aufschmelzen, 40 s Hybridisierung der Oligonukleotide an die Einzelstränge bei der geeigneten Temperatur und je nach Länge des PCR-Produkts 30 s bis 3 min Polymerase-Reaktion bei 72°C. Zur Fertigstellung unvollständiger DNA-Stränge wurde abschließend 10 min bei 72°C inkubiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 20 ng DNA, 1 U Taq-Polymerase, 10 pmol jedes Oligonukleotids, 6,25 nmol pro dNTP und 75 nmol MgCl₂. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abschnitt 2.2.1.11).

2.2.1.9 Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der Transgen- bzw. Maus-β-Globin-Gen-Kopienzahl mittels Echtzeit-PCR wurde der eine Hot-Start Taq-Polymerase enthaltende ImmoMix (Hot-Start Taq-Polymerase, optimierte MgCl₂- und dNTP-Konzentrationen) der Firma Biorline verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Pro Reaktion wurden 20 ng DNA, 200 nM je Oligonukleotidprimer sowie 1x SYBR Green-Lösung eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen waren:

	7 min	95°C	Hot Start
sowie 36 Zyklen:	30 s	94°C	Denaturierung
	25 s	58°C	Annealing
	25 s	72°C	Elongation

Nach Beendigung der 36 Zyklen wurde für alle Reaktionen eine Schmelzkurve im Temperaturbereich von 95°C bis 58°C aufgenommen, um das Auftreten von unspezifischen PCR-Nebenprodukten zu überprüfen.

Zur Quantifizierung der Gen-Kopienzahlen wurden folgende Oligonukleotid-Primerpaare verwendet:

<i>hSULT1A1/1A2</i> -Transgen:	RT_2_F	RT_3_R	241 bp
	nPACrep fw	nPACrep rev	239 bp

<i>hSULT1B1</i> -Transgen:	nPACrep fw	nPACrep rev	239 bp
murines β -Globin-Gen:	mhBGlob fwII	mhBGlob revII	299 bp

Die Quantifizierung der Kopienzahlen erfolgte anhand von Standardreihen. In jedem Echtzeit-PCR-Experiment wurden eine Standardreihe für das untersuchte Transgen und eine Standardreihe für das murine β -Globin-Gen mitgeführt. Sowohl für die DNA-Proben als auch für die Standardreihen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Standardreihen wurde aufgereinigtes PCR-Produkt, dessen Sequenz die in der jeweiligen PCR zu quantifizierende Sequenz enthielt, in Verdünnungen von 10^3 bis 10^8 Molekülen verwendet.

Für die Standardreihe der PCR nPACrep fw/nPACrep rev wurde das nPACrep fw/nPACrep rev-PCR-Produkt verwendet. Für die anderen Standardreihen wurden PCR-Produkte erzeugt, die sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich länger waren als das in der Echtzeit-PCR erzeugte Produkt. Die dafür verwendeten Primer waren:

RT_2_F/3_R-PCR:	RTtempl_F	RTtempl_R	604 bp
mhBGlob fwII/revII-PCR:	glob-sal fw	glob-sal rev	1462 bp

Zum Vergleich der Transgen-Kopienzahlen in den Proben, die in einem Echtzeit-PCR-Experiment eingesetzt wurden, wurde der Quotient aus Transgen-Kopienzahl und Maus- β -Globin-Gen-Kopienzahl errechnet. Zum Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Echtzeit-PCR-Experimenten wurden zwei der DNA-Proben in beiden Experimenten mitgeführt. Um die Transgen-Kopienzahlen in den *hSULT1A1/1A2*- und den *hSULT1B1*-transgenen Linien vergleichen zu können, wurde die Transgen-Kopienzahl mit dem Primerpaar nPACrep fw/nPACrep rev, die einen Sequenzabschnitt des für beide Konstrukte identischen PAC-Rückgrates amplifizieren, quantifiziert.

2.2.1.10 Untersuchung des Integrationsorts mittels Genome Walking

Die Untersuchung des genomischen Integrationsortes der Transgene ins Mausgenom wurde unter Verwendung des Genome Walker Universal Kit (Firma Clontech) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Genom-Bibliotheken wurden aus muriner Leber-DNA erstellt (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.1.11 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese im Flachbettssystem wurden, je nach zu erwartender Fragmentgröße, Gele aus 0,5 - 4% Agarose mit Ethidiumbromid (0,004%) in TAE-

Puffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung von 80 V in TAE-Puffer. Als Größenstandard wurden Gene Ruler™ DNA Ladder Mix bzw. *EcoRI*- und *HindIII*-geschnittene DNA des Phagen λ (Fermentas) verwendet.

2.2.1.12 Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) zur Darstellung der chromosomalen Integrationsorte der Transgene wurde im FISH-Labor von Dr. T. Liehr, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Jena, Abteilung Molekulare Cytogenetik, mit dem nPAC-Konstrukt und dem hSULT1B1-PAC als Sonden und unter Verwendung des Sky-Paint-Kit-DNA-M10 durchgeführt (LIEHR 2006; LIEHR *et al.* 2006).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung

Der Proteinanteil von Zytosolen wurde photometrisch in Dreifachbestimmungen mit der Bicinchoninsäure-(BCA)-Methode quantifiziert. Zur Herstellung der Eichreihe wurde BSA verwendet.

2.2.2.2 Präparation von subzellulären Fraktionen aus Mäusegeweben

Die Gewebeprobe wurden in Mukosapuffer bei 4°C homogenisiert. Nach Zentrifugation (20 min, 9000 x *g*, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und durch Ultrazentrifugation (1 h, 100 000 x *g*, 4°C) in Zytosol- (Überstand) und Mikrosomenfraktion (Pellet) aufgetrennt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C verwahrt.

2.2.2.3 SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970). Zur Denaturierung wurden die Proben für 5 min bei 95°C in Solubilisierungspuffer inkubiert. Es wurden 3%ige Sammelgele und 11%ige Trenngele verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch halbtrockenes Elektrophoretogramm (KYHSE-ANDERSEN 1984) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Für den immunologischen Proteinnachweis wurden alle freien Bindungsstellen der Membran durch eine einstündige Inkubation in Blockierungslösung abgesättigt. Anschließend wurde einstündig mit dem Primärantikörper inkubiert, dreimal in TBS-T gewaschen (je 10 min) sowie einstündig mit dem als Sekundärantikörper eingesetzten Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Schaf-IgG-Peroxidasekonjugat inkubiert und in Folge erneut

wie oben gewaschen. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken, die Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt.

Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wird die Luminol-Wasserstoffperoxid-Reaktion katalysiert. Inkubation und Detektion wurden nach der Vorschrift des ECL™ Western Blotting Detection Kits durchgeführt. Die dabei erzeugte Chemilumineszenz wurde mit dem Luminescent Image Analyser LAS-1000 aufgenommen. Die Blots wurden mit der Software AIDA dargestellt und semiquantitativ analysiert. Um den Blot mit weiteren Primärantikörpern testen zu können, wurden die gebundenen Antikörper durch eine 45minütige rotierende Inkubation bei 60°C entfernt und die Membran anschließend zweimal für 10 min in TBS-T gewaschen.

2.2.2.4 PAP³⁵S-Assay zur Messung der Sulfotransferase-Aktivität

Die Aktivität der SULT1A1 und SULT1A2 wurde mit einer radioenzymatischen Methode (FOLDES und MEEK 1973) mit PAP³⁵S als Sulfonat-Donor bestimmt. Dabei wird die SULT-katalysierte Übertragung der ³⁵S-markierten Sulfonatgruppe des Cofaktors auf eine Akzeptorgruppe eines spezifischen Substrates gemessen. Nach einer definierten Reaktionszeit wird nicht verbrauchtes PAP³⁵S ausgefällt, während das Produkt im Überstand verbleibt. Die Radioaktivität des Überstandes wird gemessen und aus dieser die spezifische Aktivität des Enzyms berechnet.

Die Proben wurden als Doppelwert bestimmt und mit jeder Probe ein Blindwert angesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten 20 µg (Leber) bzw. 50 µg (Kolon) Protein. Ein die entsprechende Proteinmenge enthaltendes Volumen wurde mit KCP-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 110 µl aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 20 µl Substratlösung oder H₂O (Blindwerte) pipettiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 10 µl der nichtradioaktiven PAPS-Lösung (4 µM) und der PAP³⁵S-Gebrauchslösung (1 µM) gestartet. Nach 10 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 0,1 M Bariumacetat gestoppt. Überschüssiges PAPS wurde mit 200 µl 0,1 M Bariumhydroxid und 200 µl 0,1 M Zinksulfat gefällt. Nach Zentrifugation (15800 x g, 3 min) wurden 500 µl des Überstandes in Szintillationsgefäße, in denen 4 ml Szintillationscocktail vorgelegt waren, überführt. Nach Durchmischen wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen. Zur Feststellung der maximal verbrauchbaren Radioaktivität (Total count) wurden 10 µl PAP³⁵S mit 750 µl H₂O vermischt und 500 µl dieser Mischung wie beschrieben vermessen. Aus den Ergebnissen der Szintillationsmessung wurden die spezifischen Enzymaktivitäten in pmol verbrauchtes PAPS/min Inkubationszeit/mg eingesetztes Protein nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{(\text{Mittelwert counts(Probe)} - \text{count(Blindwert)})}{\text{Total count}} \times \frac{50 \text{ pmol PAPS}}{(\text{mg Protein} \times 10 \text{ min})}$$

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Erzeugung von Mitosestadien muriner Lymphozyten

Die Kultivierung der murinen Lymphozyten erfolgte in Vollblut entsprechend eines Protokolls des Jackson Laboratory (http://www.jax.org/cyto/blood_preps.html). Den acht Wochen alten Mäusen wurde mit Hämatokritkapillaren (Innenbeschichtung Natrium-Heparinat) durch Punktion des retrobulbären Venenplexus 120 µl Blut entnommen. Das Blut wurde mit 100 µl Heparinlösung vermischt und bis zur Weiterverarbeitung bei RT verwahrt. In Nunclon-Zellkulturröhrchen wurden 950 µl Gentamycin-Medium, 100 µl PHA-M-Lösung, 100 µl LPS-Lösung und 150 µl fötales Rinderserum vorgelegt und bei 4°C verwahrt. Nach Zugabe der Blut-Heparin-Mischung wurden die Kulturen bei 37°C schwenkend im Wasserbad inkubiert, wobei durch eine schräge Positionierung der Röhrchen eine größtmögliche Oberfläche der Blutkultur erreicht wurde. Die Blutzellen wurden dreimal täglich durch Aufschütteln im Medium resuspendiert. Nach 43 h wurden 375 ng Colcemid zugeben und die Inkubation für weitere 15 min fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in gläserne Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C herunterzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes bis auf 1 ml wurden unter Vortexen erst ein-, dann zweimal 2 ml 40 mM KCl zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Es folgte unter Vortexen die Zugabe von 1 ml eiskaltem Fixativ (3 VT Methanol/1 VT Eisessig), eine Wiederholung des Zentrifugationsschritts und des Absaugens und eine Zugabe von erst 1 ml, dann zweimal 2 ml eiskaltem Fixativs. Nach erneuter Wiederholung dieser Prozedur wurden die mitotischen Lymphozyten in 5 ml Fixativ bis zur Weiterbearbeitung im Kühlschrank verwahrt.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Vorbereitung der Proben

Die Gewebe wurden nach der Entnahme für 24 h in 4% Formalin gelegt und anschließend 24 h mit Leitungswasser gespült. Das Wasser wurde im Entwässerungsautomaten gegen Toluol ausgetauscht und die Proben in Paraffin eingeschmolzen. Aus den Wachsböcken wurden mit einem Rotationsmikrotom Schnitte von 2 µm Dicke

angefertigt. Diese wurden durch Trocknen bei 37°C auf den Objektträgern fixiert. Die Gewebsschnitte wurden in Toluol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert.

Dehydrierung der Gewebeproben:					Entparaffinierung und Rehydrierung:		
Ethanol	55%	45 min	40 °C	kein Vakuum	Toluol	100%	120 s
Ethanol	70%	50 min	40 °C	kein Vakuum	Toluol	100%	180 s
Ethanol	96%	30 min	40 °C	kein Vakuum	Ethanol	100%	120 s
Ethanol	96%	60 min	40 °C	kein Vakuum	Ethanol	100%	180 s
Ethanol	100%	120 min	40 °C	kein Vakuum	Ethanol	96%	100 s
Ethanol	100%	150 min	40 °C	Vakuum	Ethanol	70%	100 s
Toluol	100%	120 min	40 °C	Vakuum	Ethanol	40%	100 s
Toluol	100%	150 min	40 °C	Vakuum	H ₂ Odest.		80 s
Paraffin		90 min	60 °C	Vakuum			
Paraffin		150 min	60 °C	Vakuum			

2.2.4.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde im Färbeautomaten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe bei Raumtemperatur dehydriert. Anschließend wurden die Gewebsschnitte in Kunstharz eingeschlossen.

HE-Färbung:		Dehydrierung:	
Hämalaun	60 s	Ethanol	70% 20 s
Leitungswasser	330 s	Ethanol	96% 25 s
H ₂ O _{dest.}	20 s	Ethanol	100% 130 s
Eosin (1%)	45 s	Ethanol	100% 180 s
Leitungswasser	30 s	Toluol	100% 180 s
H ₂ O _{dest.}	15 s	Toluol	100% 240 s

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Begrenzung der zur Immunfärbung verwendeten Lösungen wurde mit einem Silikonstift ein Kreis um die Gewebeschnitte gezogen. Die Objektträger wurden 3 min in destilliertem Wasser gespült, zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 min mit 1%iger H₂O₂-Lösung inkubiert, 2 x 3 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend 1 min in PBS/Tween und 1 min in PBS gewaschen.

Die immunhistochemische Färbung wurde bei Verwendung des Antiserums C (im Kaninchen erzeugt) nach der 2-Schritt EnVision™-Methode durchgeführt. Die Inkuba-

tion mit dem Primärantikörper (Verdünnung in Antikörperverdünnungsmedium: 1:6000 für die murine Leber, 1:15000 für die anderen murinen Gewebe, 1:8000 für das humane Kolon) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Feuchthaltekammer. Vor der 30minütigen Inkubation (RT) der Schnitte mit dem unverdünnten EnVision™-Polymer wurden sie 3 x 3 min mit PBS/Tween und 1 x 3 min mit PBS gewaschen.

Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde ein 3,3'-Diaminobenzidin-Mix (1 ml Substrat-Puffer + 45 µl DAB) auf die Schnitte aufgebracht, 1 min inkubiert und mit destilliertem Wasser abgespült. Die Schnitte wurden dehydriert (Abschnitt 2.2.4.2) und in Kunstharz eingeschlossen. Bei Verwendung des Antiserums 1B1s (im Schaf erzeugt) wurde ein biotinylierter, gegen Schaf-IgG gerichteter Sekundärantikörper verwendet, der im nächsten Schritt von einem Avidin-HRP-Konjugat gebunden wurde. Anschließend wurde wie bei Verwendung des Antiserums C verfahren.

2.2.4.4 Mikroskopie und Mikrophotographie

Die mikroskopischen Untersuchungen und die Photodokumentation wurden mit dem Mikroskop Eclipse E1000 mit differentiellm Interferenzkontrast und Videoausrüstung (CCD-1300) durchgeführt. Es wurde das Echtfarbbildanalyzesystem LUCIA G verwendet.

2.2.5 Tierversuche

Es wurden acht Wochen alte männliche und weibliche FVB/N-Mäuse (Wildtyp- und *hSULT1A1/1A2*-transgene Mäuse der Linie 7) aus der Zucht des Max-Rubner-Laboratoriums des DIfE verwendet. Die Tiere wurden unter spezifiziert pathogenfreiem (SPF) Hygienestatus bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit und einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12 Stunden mit Wasser und pelletiertem Futter (Altromin 1326 Standard-Diät, Altromin, Lage) *ad libitum* gehalten.

2.2.5.1 Tiertötung zur Organentnahme

Vor der Tötung zur Organentnahme für Immunblot und Immunhistochemie durch zervikale Dislokation wurden die Tiere über Nacht nüchtern gehalten. Die entnommenen Organe wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Darm wurde in Abschnitte unterteilt, mit steriler Kochsalzlösung gespült und auf einer eisgekühlten Platte längs eröffnet. Die Mukosa wurde abgeschabt, mit 200 µl Mukosa-Puffer versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Tierversuche mit PhIP und 1-HMP

Den Mäusen wurde 400 μmol (90 mg) pro kg KG PhIP oral (wässrige Lösung) bzw. 83,3 μmol (19 mg) pro kg KG 1-HMP (50 mM Lösung in DMSO) als intraperitoneale Injektion verabreicht. Während des Versuchs erfolgte die Haltung in Stoffwechselfähigen mit Wasser und mehlartigem Futter (ssniff R/M-H, Mehl, ssniff, Soest) *ad libitum*. Urin und Faeces wurden für spätere Analysen gesammelt. Tötung und Organentnahme erfolgten wie in Abschnitt 2.2.5.1 angegeben.

2.2.6 Bestimmung von DNA-Addukten mittels ^{32}P -Postlabeling

2.2.6.1 Bestimmung von PhIP-DNA-Addukten

Die getrockneten DNA-Proben (1-5 μg , meist 2,5 μg) wurden mit Mikrokokkus-Nuklease (0,12 mU/ μl) und Kalbsmilz-Phosphodiesterase (4 mU/ μl) in Natrium-Succinat-Puffer in einem Volumen von 9,6 μl 4 h bei 37°C hydrolysiert. Die erzeugten 3'-Phosphomononukleotide wurden mit γ - ^{32}P -ATP (50 μCi , ≥ 7000 Ci/mmol) durch T4-Polynukleotidkinase (0,46 U/ μl) in Kinasepuffer für 30 min bei 37°C markiert. Die multidirektionale Dünnschichtchromatographie wurde wie von Gupta *et al.* (1982) beschrieben auf Polyethylenimin-imprägnierten Celluloseplatten (PEI-TLC-Platten) mit den Fließmitteln D1, D3, D4 und D4+ durchgeführt. Die Radioaktivität auf den Chromatographiekarten wurde mit dem InstantImager gemessen und mit der zugehörigen Gerätesoftware ausgewertet (CPM pro Fleck abzüglich der Hintergrundaktivität).

Ausgewertet wurde der PhIP-C8-dG-Adduktfleck. Jede Probe wurde doppelt analysiert. Wichen die Einzelwerte der Doppelbestimmung um mehr als den Faktor 2 voneinander ab, so wurden die Proben erneut analysiert. Bei jeder Messung wurde ein PhIP-Standard (0,25 μg mit PhIP addukturierter Heringssperma-DNA) mitgeführt, um den Erfolg der Methode zu kontrollieren.

Die Berechnung des Adduktniveaus erfolge nach folgender Formel:

$$\text{Addukte pro } 10^8 \text{ Nukleotide} = \frac{\text{net CPM} \times 33 \times \text{AF}}{\mu\text{g DNA} \times \text{spez. Akt.}}$$

net CPM	CPM des Adduktflecks
33	Umrechnungsfaktor von fmol Addukt/ μg DNA zu Addukten/ 10^8 Nukleotide
AF	Aliquotfaktor, falls nicht der gesamte Ansatz auf die TLC-Karte aufgetragen wurde

µg DNA	eingesetzte DNA-Menge
spez. Akt	Spezifische Aktivität der T4-PNK in CPM/fmol

Die „spezifische Aktivität“ der T4-PNK wurde für jede T4-PNK-Charge experimentell (REDDY und RANDEATH 1986) bestimmt. Dazu wurden 2,5 pmol 2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat (dGp) wie die DNA-Proben markiert, mit Wasser verdünnt, Aliquots auf eine PEI-TLC-Karte aufgetragen und mit Fließmittel für normale Nukleotide (NN) zweimal eindimensional entwickelt. Aus der Aktivität des pdGp-Fleckes wurde die „spezifische Aktivität“ in CPM/fmol berechnet.

2.2.6.2 Bestimmung von 1-HMP-DNA-Addukten

Die Bestimmung von 1-HMP-DNA-Addukten mittels ^{32}P -Postlabeling erfolgte nach der von Ma (2001) beschriebenen Methode ohne Apyrase-Behandlung. 5 µg DNA wurden 2 h mit Mikrokokus-Nuklease (0,12 mU/µl) und Kalbsmilz-Phosphodiesterase (4 mU/µl) in Natrium-Succinat-Puffer in einem Volumen von 6 µl 4 h bei 37°C hydrolysiert. Die adduktierten Nukleotide wurden durch den Abbau der Normalnukleotide zu Nukleosiden durch Nuklease P1 angereichert. Markierung mit [γ - ^{32}P]-ATP, multidirektionale Dünnschichtchromatographie sowie Visualisierung und Quantifizierung der Adduktstellen erfolgten wie unter 2.2.6.1 beschrieben. Als Standard wurden 2,5 µg mit 1-MP addukturierter Heringssperma-DNA (DONATH 2008) mitgeführt. Ausgewertet wurden die in Abbildung 35 markierten Flecken.

2.2.7 Statistik

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangnummern-Tests wurde geprüft, ob sich die Ergebnisse der Versuchsgruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Als signifikanter Unterschied wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen, eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ galt als hoch-, von $p < 0,001$ als höchstsignifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der transgenen Mauslinien

3.1.1 Charakterisierung und Bearbeitung der Transfektionsvektoren

Zur Erstellung transgener Mauslinien für den Gencluster der humanen Sulfotransferasen *SULT1A1* und *SULT1A2* sowie für die humane *SULT1B1* wurde der Ansatz gewählt, die Transgene in Form humaner genomischer DNA-Abschnitte in das Genom der Mäuse einzubringen. Dadurch sollten nicht nur die humanen Gensequenzen, sondern zusätzlich große flankierende Abschnitte der Gene, auf denen Bereiche der Transkriptionsregulation vermutet wurden, mit in das Mausgenom integriert werden. Durch diesen experimentellen Ansatz sollte eine den humanen Genen entsprechende gewebespezifische Genexpression erreicht und der Einfluss des Integrationsorts im Mausgenom auf die humanen Sequenzen minimiert werden. Die verwendeten humanen genomischen DNA-Abschnitte stellten Teile humaner Genombibliotheken des Roswell Park Center Institute (RPCI) dar. Das humane Genom in diesen Bibliotheken liegt unterteilt in Abschnitte einer Größe von 100 bis 300 kb integriert in PAC-Vektoren vor. PAC steht für „P1-derived artificial chromosome“ und PAC-Vektoren sind vom Bakteriophagen P1 abgeleitete, speziell für die bakterielle Vermehrung sehr großer Inserts entwickelte Klonierungssysteme. PAC-Klone, in denen die DNA-Abschnitte der humanen *SULT1A1* und *SULT1A2* sowie *SULT1B1* enthalten waren, wurden vom Kooperationspartner (Abteilung Himmelbauer des MPI für Molekulare Genetik (Berlin)) mittels Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde identifiziert und zur Verfügung gestellt. Um herauszufinden, welche dieser PAC-Konstrukte am besten zur Erzeugung der transgenen Mauslinien geeignet sind, wurden sie von den Enden des Vektors, ausgehend von den Sp6- bzw. T7-Promotorsequenzen, beidseitig je ca. 700-900 bp weit in den humanen DNA-Bereich sequenziert. Durch Abgleich dieser Sequenzen mit den Daten des Humangenomprojekts konnten die Enden der humanen DNA-Abschnitte identifiziert werden. Anhand dieser Informationen wurde das Konstrukt identifiziert, das den größtmöglichen Sequenzbereich stromaufwärts der humanen Sulfotransferase-Gene aufwies, gleichzeitig aber keine weiteren humanen Gene enthielt.

Zur Erzeugung der transgenen Mauslinien wurden die aufgereinigten, mittels *SaI*-Restriktionsverdau linearisierten PAC-Konstrukte in den männlichen Vorkern der befruchteten Maus-Oozyte des Inzuchtstammes FVB/N injiziert. Die manipulierten Oozyten wurden scheinsschwangeren Ammenweibchen implantiert und die resultierenden Nachkommen auf das Vorkommen von transgenen sogenannten „Founder-Tieren“ untersucht.

3.1.1.1 *SULT1A1/1A2*-Locus

Die humanen *SULT1A1*- und *SULT1A2*-Gene sind mit 4,4 bzw. 5,2 kb verhältnismäßig kurze Gensequenzen, die nur 8,6 kb von einander entfernt in Kopf-zu-Schwanz-Orientierung auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 liegen. Da keine Informationen vorlagen, welche Sequenzen die gewebespezifische Expression dieser Gene regulieren, wurde beschlossen, ein beide Gene enthaltendes DNA-Fragment in die Mäuse zu überführen. Vom Kooperationspartner konnten vier, die humanen *SULT1A/1A2*-Sequenzen in Sequenzbereichen unterschiedlicher Größe enthaltende PAC-Vektoren identifiziert (Tabelle 1) und zur Verfügung gestellt werden. Nach den Daten des Humangenomprojekts gestaltet sich die genomische Umgebung der humanen *SULT1A1* und *SULT1A2* folgendermaßen: Stromabwärts der *hSULT1A2* schließt sich auf dem Gegenstrang, in Schwanz-zu-Schwanz-Orientierung zu *hSULT1A2* unmittelbar das Gen *CCDC101* (coiled-coil domain containing 101) mit einer Länge von etwa 38 kb an, das für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Nach 15 kb folgt das 1,7 kb große Gen *NUPR1* (nuclear protein1), das für einen Transkriptionsregulator unbekannter Funktion kodiert. Im Stromaufwärtsbereich von *hSULT1A1* liegt mit einem Abstand von ca. 28 kb der etwa 21 kb große Locus *LOC728734*, dessen hypothetische mRNA Ähnlichkeit mit einem nierenspezifischen Protein besitzt.

Bei Klon 7 (Tabelle 1) waren sowohl stromabwärts das Gen *CCDC101*, als auch stromaufwärts der Locus *LOC728734* vollständig vorhanden. Bei Klon 8 war zwar der Bereich stromabwärts von *hSULT1A2* mit 29 kb so kurz, so dass die kodierenden Sequenzen *NUPR1* und *CCDC101* nicht bzw. unvollständig vorlagen. Allerdings war in diesem Klon der Bereich stromaufwärts der *hSULT1A1* mit 52,2 kb so lang, dass der Locus *LOC728734* vollständig enthalten war. Bei Klon 9 war der putative regulatorische Bereich stromaufwärts der *hSULT1A1* deutlich kürzer als bei Klon 1, so dass möglicherweise transkriptionsrelevante Bereiche nicht mit in die Maus überführt worden wären. Auch bestand bei Klon 9 nicht die Möglichkeit, die zusätzlichen humanen Gene mittels gentechnischer Methoden zu eliminieren.

Tabelle 1: Zur Verfügung stehende PAC-Vektoren, die humanen *SULT1A1/1A2* enthalten. Die Konstrukte sind Teile humaner Genombibliotheken des Roswell Park Center Institute (RPCI). us (upstream): stromaufwärts, ds (downstream): stromabwärts

PAC-Nr. / RPCI-Klon	Größe (kb)	kb us von <i>hSULT1A1</i>	kb ds von <i>hSULT1A2</i>	Orientierung im Vektor	enthaltene Gensequenzen
1/704J18921Q2	133,5	36,4	63,0	T7 us von <i>hSULT1A1</i>	<i>hSULT1A1</i> , <i>hSULT1A2</i> , <i>NUPR1</i> , <i>CCDC101</i>
7/704B06659Q2	139,7	56,8	48,7	Sp6 us von <i>hSULT1A1</i>	<i>hSULT1A1</i> , <i>hSULT1A2</i> , <i>LOC728734</i> , <i>CCDC101</i>
8/709O23161Q2	116,1	52,2	29,0	Sp6 us von <i>hSULT1A1</i>	<i>hSULT1A1</i> , <i>hSULT1A2</i> , <i>LOC728734</i>
9/704J11868Q2	126,8	23,0	69,6	Sp6 us von <i>hSULT1A1</i>	<i>hSULT1A1</i> , <i>hSULT1A2</i> , <i>NUPR1</i> , <i>CCDC101</i>

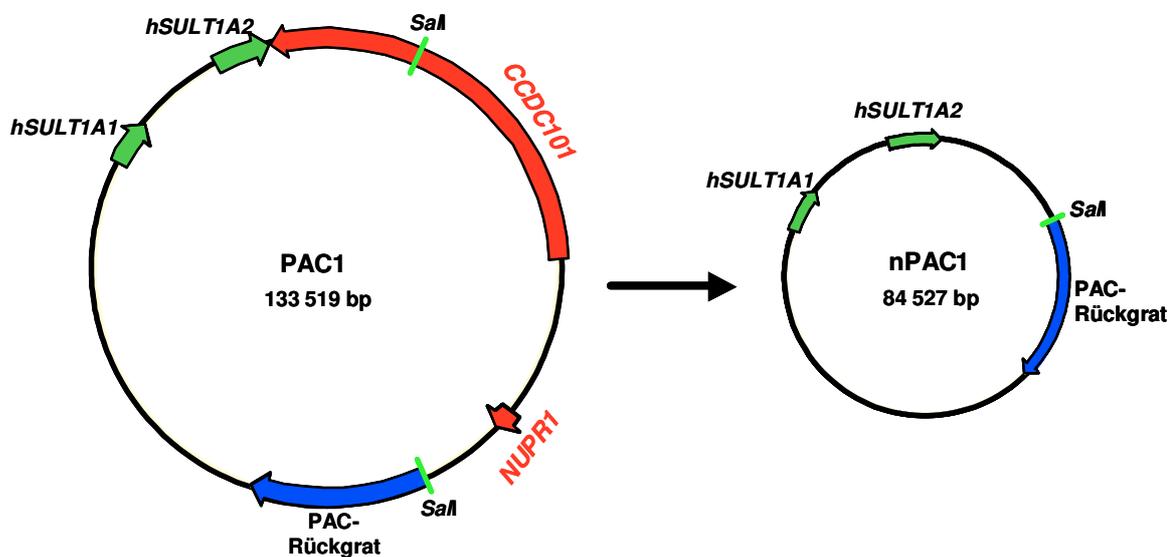


Abbildung 5: *SalI*-Verdau und Religation des PAC-Konstrukts Nr.1 (PAC1). Der 133,5 kb große, die humanen *SULT1A1*- sowie *SULT1A2*-Gene enthaltende PAC1 wurde mittels *SalI*-Restriktionsverdau und Religation um knapp 50 kb verkleinert und damit die zwei kodierenden Sequenzen *CCDC101* und *NUPR1* 3' der humanen *SULT1A2* eliminiert bzw. zerstört.

Klon 1 erwies sich nach Abgleich der Enden des humanen DNA-Abschnitts mit dem Humangenomprojekt als das zur Erzeugung der transgenen Mäuse geeignetste Konstrukt. Bei diesem Klon war der Stromaufwärtsbereich der *SULT1A1* mit 36,4 kb ausreichend lang und enthielt nicht den Locus LOC728734. Des Weiteren bestand bei diesem Klon aufgrund der Lage einer *SaII*-Schnittstelle die Möglichkeit, mittels *SaII*-Restriktionsverdau und anschließender Religation stromabwärts von *SULT1A2* zur *SaII*-Schnittstelle des Vektor-Rückgrats (Abbildung 5) das Konstrukt um ca. 50 kb zu verkleinern und damit *NUPR1* und den Promotorbereich sowie Exon I von *CCDC101* zu eliminieren. Der nach der Religation als nPAC1 bezeichnete Klon 1 wurde durch *XbaI*-, *XbaI*-/*KpnI*-, *NotI*- und *NotI*-/*SgfI*-Restriktion auf das Vorhandensein der korrekten Restriktionsfragmentlängen überprüft, bevor er zur Mikroinjektion verwendet wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.1.1.2 *SULT1B1*-Locus

Das humane *SULT1B1*-Gen ist mit 33,5 kb eines der größten humanen *SULT*-Gene und liegt mit einem Abstand von 31 kb stromaufwärts des Pseudogens *hSULT1D1P* auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (MEINL und GLATT 2001). Zur Erstellung der für die humane *SULT1B1* transgenen Mauslinien konnte vom Kooperationspartner ein die humane *SULT1B1*-Sequenz enthaltender PAC-Klon identifiziert (Tabelle 2) und zur Verfügung gestellt werden. Das Hineinsequenzieren in den humanen DNA-Abschnitt zeigte, dass der Klon außer dem humanen *SULT1B1*-Gen und dem Pseudogen *hSULT1D1P* keine weiteren bekannten kodierenden Sequenzen enthielt (Tabelle 2, Abbildung 6) und daher unverändert zur Erzeugung der transgenen Linien verwendet werden konnte.

Tabelle 2: PAC-Vektor, die humanen *SULT1B1* enthaltend. Das Konstrukt ist Teil einer humanen Genombibliothek des Roswell Park Center Institute (RPCI). us (upstream): stromaufwärts, ds (downstream): stromabwärts

PAC-Nr. / RPCI-Klon	Größe (kb)	kb us von <i>hSULT1B1</i>	kb ds von <i>hSULT1B1</i>	Orientierung im Vektor	enthaltene Gensequenzen
1/704789L15	148,8	67,5	31,7	T7 us von <i>hSULT1B1</i>	<i>hSULT1B1</i> , <i>hSULT1D1ψ</i>

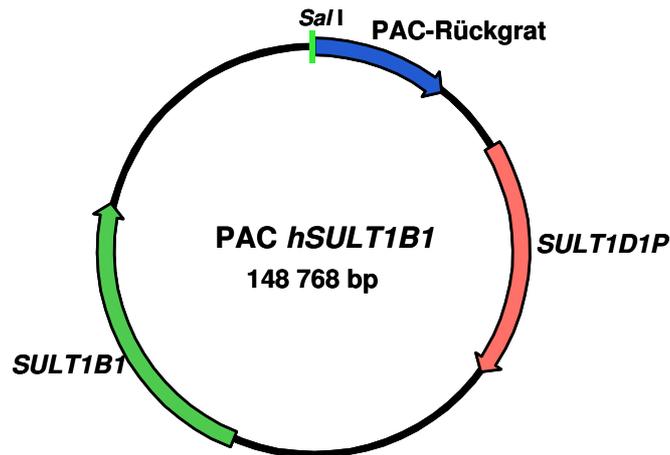


Abbildung 6: Das zur Herstellung der *hSULT1B1*-transgenen Linien eingesetzte PAC-Vektorkonstrukt. Das Konstrukt enthält außer der humanen *SULT1B1* sowie dem Pseudogen *hSULT1D1P* keine weiteren bekannten kodierenden Sequenzen. Die Linearisierung für die Mikroinjektion erfolgte mittels *SalI*-Restriktionsverdau.

3.1.2 Genotypisierung der Founder und der ersten Filialgeneration

Die DNA der Mäuse, die sich aus den manipulierten Oozyten entwickelt hatten, wurde mittels PCR hinsichtlich Transgenität untersucht. Es wurden verschiedene Abschnitte der humanen Sequenzen amplifiziert, um die Integrität der Transgene zu überprüfen. Mäuse, bei denen Transgenität und Integrität nachgewiesen werden konnten, begründeten jeweils eine transgene Linie (sogenannte „Founder“ einer transgenen Linie), die nach der Tiernummer des jeweiligen Founders benannt wurde. Die Transgenität sowie Transgen-Integrität in der ersten Filialgeneration (F1) der transgenen Linien wurde in derselben Weise überprüft. Für die Genotypisierung der Folgegenerationen war es ausreichend, jeweils nur eines der in den folgenden Abschnitten beschriebenen PCR-Experimente durchzuführen.

3.1.2.1 Genotypisierung der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse

Zum Nachweis der Transgenität für die humanen *SULT1A1* und *-1A2* wurden die in Abbildung 3B dargestellten vier Abschnitte des *hSULT1A1/1A2*-Gencluster-Konstrukts amplifiziert (Abbildung 7). Es wurden drei für dieses Konstrukt transgene Foundertiere identifiziert. Sie begründeten die *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linien 7, 633 und 714. Die Tiere der drei Linien waren in hemizygotem Zustand von unauffälligem Phänotyp. Um ihre Lebenserwartung abzuschätzen, wurden zwei männliche und zwei weibliche hemizygoten Tiere der Linie 7 nach Abschluss der Zuchtphase nicht getötet. Diese vier Mäuse erreichten alle ein Alter von zwei Jahren.

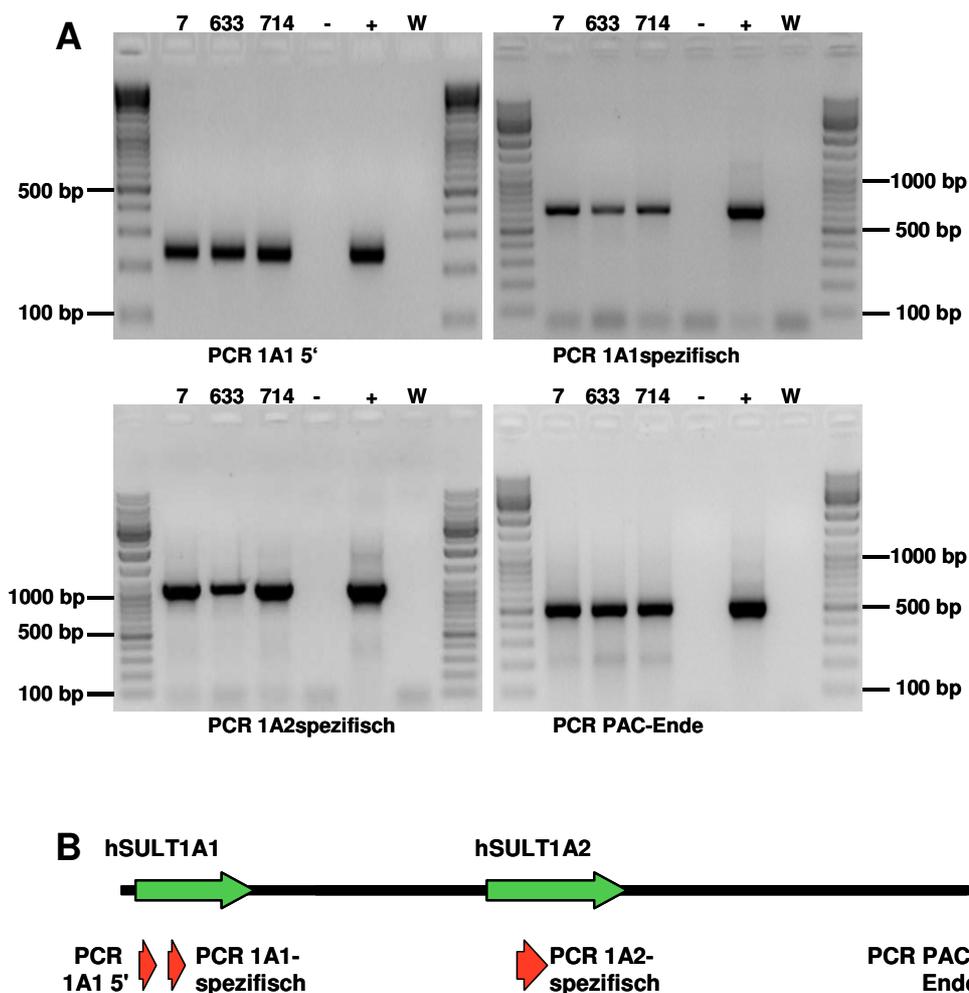


Abbildung 7: PCR-Experimente zur Genotypisierung der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien. A) 7, 633 und 714 entsprechen den transgenen Linien dieses Namens, - einer Wildtyp-Maus als Negativkontrolle, + dem nPAC1 als Positivkontrolle, W einer Wasserkontrolle als Nullprobe. Die Größen der amplifizierten Abschnitte sind: 241 bp für PCR 1A1 5' (Primer: RT_2_F/RT_3_R), 656 bp für PCR 1A1spezifisch (Primer: Hast23NcoS/1A1In4R), 1094 bp für PCR 1A2spezifisch (Primer: Hast23NcoS/1A2In4R) und 508 bp für PCR PAC-Ende (Primer: 1A1Pac3end_F/1A1Pac3end_R). Die Primer sind in Abschnitt 2.1.9 tabellarisch aufgeführt. B) Schematische Darstellung der Lage der amplifizierten Bereiche.

3.1.2.2 Genotypisierung der *hSULT1B1*-transgenen Mäuse

Da das *hSULT1B1*-Gen mit 33,5 kb eine verhältnismäßig lange Gensequenz darstellt, wurden zur Genotypisierung der auf Transgenität für dieses Gen zu überprüfenden Tiere fünf verschiedene Abschnitte sowie ein Abschnitt des 5'-flankierenden Bereichs 9000 bp stromaufwärts des kodierenden Bereiches amplifiziert (Abbildung 8). Es wurden drei transgene Tiere identifiziert, in denen alle sechs untersuchten Bereiche nachweisbar waren. Diese begründeten die transgenen Linien 5, 12 und 275. Auch die

Tiere dieser drei Linien waren in hemizygotem Zustand von unauffälligem Phänotyp. Um ihre Lebenserwartung abzuschätzen, wurden je zwei männliche und zwei weibliche Tiere aller drei Linien nach Abschluss der Zuchtphase nicht abgetötet. Die Mäuse erreichten alle ein Alter von mindestens 1,5 Jahren.

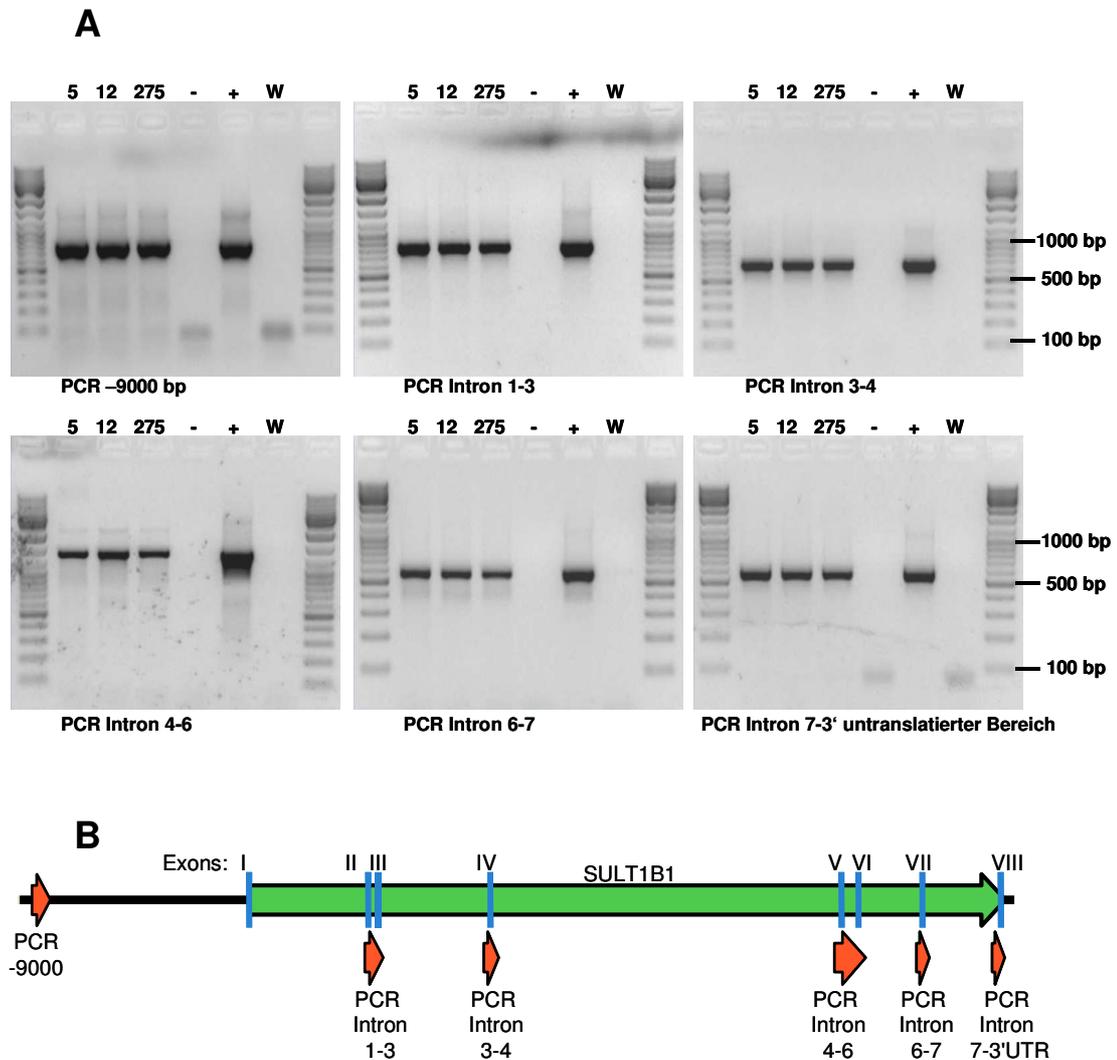


Abbildung 8: PCR-Experimente zur Genotypisierung der *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien. A) 5, 12 und 275 entsprechen den transgenen Linien dieses Namens, - einer Wildtyp-Maus als Negativkontrolle, + dem PAC *hSULT1B1* als Positivkontrolle, W einer Wasserkontrolle als Nullprobe. Die Größen der amplifizierten Abschnitte sind: 796 bp für die PCR -9000 bp (Primer: , 804 bp für die PCR Intron 1-3 (Primer: 1B1In1F/1B1In3R), 670 bp für die PCR Intron 3-4 (Primer: 1B1In3F/1B1In4R), 1365 bp für die PCR Intron 4-6 (Primer: 1B1In4F/1B1In6R), 561 bp für die PCR Intron 6-7 (Primer: 1B1In6F/1B1In7R) und 570 bp für die PCR Intron7-3'untranslatierter Bereich (Primer: 1B1In7F/1B13'-UTR_R). Die Primer sind in Abschnitt 2.1.9 tabellarisch aufgeführt. B) Schematische Darstellung der Lage der amplifizierten Abschnitte.

3.1.3 Zucht der transgenen Mauslinien

3.1.3.1 Zucht zur Homozygotie

Um homozygote Nachkommen aus der Verpaarung zweier hemizygoter Mäuse identifizieren zu können, wurde eine Echtzeit-PCR-Methode etabliert (Abschnitt 2.2.1.9). Für jedes zu analysierende Tier wurde der Quotient aus der ermittelten Kopienzahl des Transgens und der Kopienzahl des endogenen Maus- β -Globin-Gens gebildet. Dieser Quotient wird im Folgenden als relative Kopienzahl des Transgens bezeichnet. Er ist bei homozygot transgenen Tieren doppelt so hoch wie bei hemizygot transgenen Tieren derselben Linie (Abbildung 9). Alle drei für das *hSULT1B1*-Konstrukt transgenen Mauslinien sowie die für den *hSULT1A1/1A2*-Cluster transgene Linie 7 ließen sich zur Homozygotie züchten und in homozygotem Zustand weiter vermehren. In der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 633 ließen sich nach mehreren Verpaarungen hemizygoter Tiere keine homozygoten Nachkommen identifizieren. Auffällig war auch, dass die Wurfgrößen nach der Verpaarung zweier hemizygoter Tiere durchschnittlich geringer waren als bei der Verpaarung von hemizygoten Tieren mit dem Wildtyp.

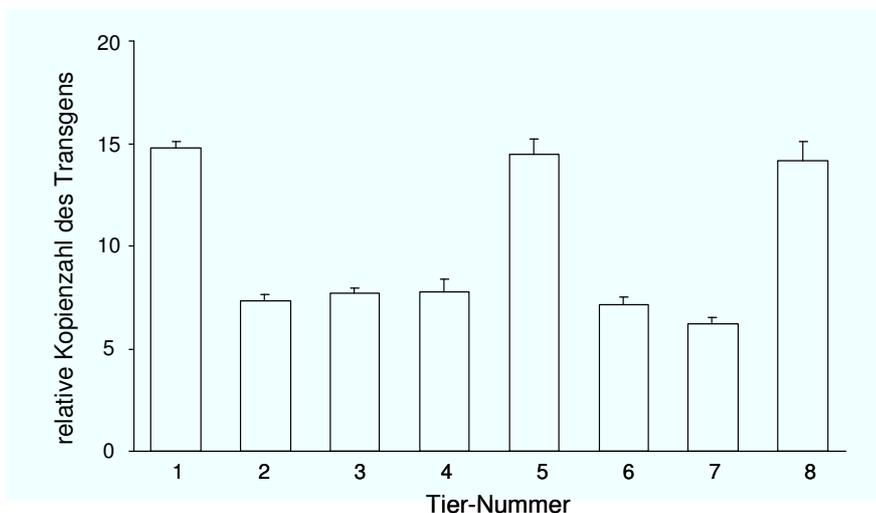


Abbildung 9: Unterscheidung zwischen homo- und hemizygoten Nachkommen der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 mittels Echtzeit-PCR. 1 bis 7 sind Geschwister-Tiere eines Wurfes, von denen 1 und 5 als homozygot identifiziert wurden. 8 ist eine Kontrolle, deren homozygoter Status durch Rückkreuzung nachgewiesen worden war. Dargestellt sind je Tier Mittelwert sowie Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Integration der Transgen-DNA in dieser Linie eine essentielle mauseigene Sequenz unterbrochen hat, da

die Tiere dieser Linie in einem für das Transgen homozygoten Zustand anscheinend nicht lebensfähig sind. Bei der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 ergab sich in der relativen Kopienzahl des Transgens kein klares 1:2-Verhältnis zwischen den untersuchten Tieren. Der Grund dafür war das Vorliegen von zwei Integrationsorten der Transgen-DNA in unterschiedlichen Chromosomen mit jeweils unterschiedlicher Kopienzahl (Abschnitt 3.2.1 Bestimmung des chromosomalen Integrationsorts des Transgens sowie Abschnitt 3.1.3.2 Zucht von Sublinien in der Linie 714-tg-*hSULT1A1/1A2*).

3.1.3.2 Zucht von Sublinien in der Linie 714 tg-*hSULT1A1/1A2*

Die Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (Abschnitt 3.2.1) zeigte, dass sich der humane DNA-Abschnitt bei der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 in die Chromosomen 4 und 11 integriert hatte. Da sich die Fluoreszenzsignale beider Integrationsorte in ihrer Intensität deutlich voneinander unterschieden, musste davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Anzahlen integrierter humaner DNA-Abschnitte an beiden Integrationsorten vorlagen. Um Linien eines definierten Genotyps zu erhalten, war es notwendig, die beiden Integrationsorte durch Züchtung von einander zu separieren. Die Tiere jedes Wurfes wurden mittels Echtzeit-PCR hinsichtlich der relativen Kopienzahl des Transgens miteinander verglichen und die Mäuse mit dem niedrigsten Ergebnis wurden für die Zucht eingesetzt. Es wurde in zwei vorläufigen Sublinien gekreuzt. In Sublinie A wurde ausschließlich mit dem Wildtyp gekreuzt. Nach drei Generationen war die relative Kopienzahl des Transgens dieser Sublinie immer einheitlich, so dass von einem hemizygoten Zustand für einen der beiden Integrationsorte ausgegangen werden konnte. Durch Verpaarung hemizygoter Geschwister-tiere innerhalb von Sublinie A sollen für diesen Integrationsort homozygote Tiere gezüchtet werden. In Sublinie B wurden, um keinen der beiden Integrationsorte zu verlieren, ausschließlich transgene Tiere miteinander verpaart. In dieser Sublinie traten starke Schwankungen der relativen Kopienzahl des Transgens auf, so dass den meisten untersuchten Tieren bezüglich der Anzahl der Integrationsorte kein definierter Status zugeordnet werden konnte. Es wurde jedoch eine Maus identifiziert, deren relativer Kopienzahl-Wert halb so hoch war wie bei den transgenen Mäusen der Sublinie A und bis zu einem Faktor 5 niedriger als bei anderen Mäusen der Sublinie B. Der Genotyp dieser Maus könnte dem hemizygoten Zustand des zweiten der beiden Integrationsorte entsprechen. Um dies zu untersuchen, wurde das Tier mit einer Wildtyp-Maus verpaart und die relative Kopienzahl des Transgens bei den aus dieser

Verpaarung hervorgegangenen transgenen Nachkommen untersucht. Der Kopienzahlwert der Nachkommen war identisch mit dem des transgenen Elterntieres, was bestätigte, dass dessen Genotyp dem hemizygoten Zustand des zweiten Integrationsorts entsprach. In der anschließenden Generation wurden transgene Geschwistertiere dieses Wurfs miteinander verpaart und es wurden homozygote Nachkommen identifiziert. Somit werden die beiden Integrationsorte der rekombinanten DNA in ein bis zwei Zuchtgenerationen in zwei homozygoten Sublinien der Linie 714 vorliegen.

3.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Bei der Mikroinjektion der DNA in die Maus-Oozyten kann nicht beeinflusst werden, wo und wie viele Transgen-Kopien sich in das Maus-Genom integrieren. Daher unterscheiden sich auch für dasselbe Konstrukt transgene Mauslinien abhängig von Integrationsort und Kopienzahl der Transgene voneinander.

3.2.1 Bestimmung des chromosomalen Integrationsorts des Transgens

Der Nachweis des chromosomalen Integrationsorts der Transgene ist für die Etablierung einer transgenen Linie von großer Bedeutung. Liegen beispielsweise beim Founder zwei oder mehr Integrationsorte der Transgene in unterschiedlichen Chromosomen vor, so können sich diese bei der Zucht separieren und es können Sublinien entstehen, die sich hinsichtlich der Expression der Transgene stark voneinander unterscheiden können (Abschnitt 3.1.3.2). Daher wurde bei den transgenen Linien mittels Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht, in jeweils welchem Chromosomenort die Integrationsstelle des Transgen-Konstrukts liegt. Zur Detektion des Transgens wurde als Sonde die PAC-DNA eingesetzt, die zur Herstellung der transgenen Linien verwendet wurde. Um die Mäuschromosomen korrekt zuzuordnen zu können, erfolgte eine weitere Hybridisierung mit Mäuse-Ganzchromosomen-Sonden (sogenanntes Spectral-Karyotyping (SKY), durchgeführt vom FISH-Labor Dr. T. Liehr, Jena).

In Abbildung 10 sind SKY (links) und Einfarb-FISH beispielhaft für ein homozygotes Tier der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 (oben) und ein hemizygoten Tier der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 (unten) dargestellt. Für alle sechs transgenen Linien konnte der chromosomale Integrationsort des Transgens ermittelt werden (Tabelle 3). Bei den Linien 7, 633, 5, 12 und 275 lag jeweils ein Integrationsort vor, während sich bei Linie 714 die humane DNA an zwei Orten, sowohl in Chromosom 4

als auch in Chromosom 11, integriert hatte. Bei dieser Linie war die Fluoreszenz-Intensität im Chromosom 11 deutlich stärker als im Chromosom 4. Daraus kann geschlossen werden, dass sich in Chromosom 11 mehr Kopien des Transgen-Konstrukts integriert haben als in Chromosom 4.

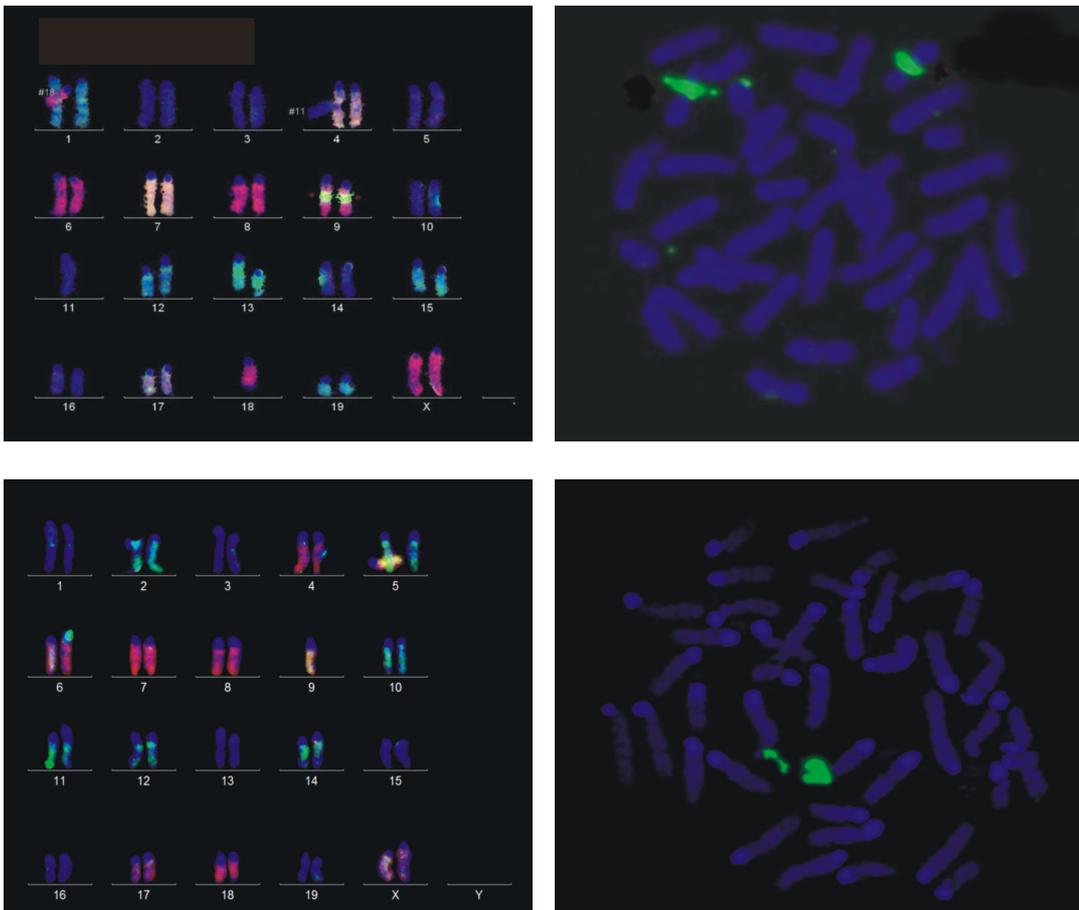


Abbildung 10: Spectral Karyotyping (SKY) (links) und Einfarb-FISH (rechts) zum Nachweis des Transgens. Es wurden die mitotischen Chromosomensätze einer homozygoten Maus der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 (oben) und einer hemizygoten Maus der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 (unten) untersucht. Bei Linie 7 konnte eine Integration in beiden Chromosomen 9 nachgewiesen werden. Linie 714 zeigte eine Integration jeweils in Chromosom 4 bzw. 11.

Tabelle 3: Mittels SKY identifizierte chromosomale Integrationsorte der Transgen-Konstrukte in den sechs transgenen Linien. Die Linien 7, 633 und 714 sind transgen für *hSULT1A1/1A2* und die Linien 5, 12, und 275 für *hSULT1B1*.

Linie	Anzahl Integrationsorte	Integration in Chromosom/Abschnitt
7	1	9 A5.3
633	1	9 F3
714	2	4 D22~23, 11 E1
5	1	10 B1
12	1	11 A1
275	1	2 A3

3.2.2 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens

Zur Erzeugung der *hSULT*-transgenen Linien wurde das Konzept verfolgt, große Abschnitte humaner genomischer DNA in die Mäuse einzubringen (Abschnitt 3.1.1). Es wurde davon ausgegangen, dass sich nur wenige Kopien des Transgen-Konstrukts in die murine DNA integrieren würden. Dazu im Widerspruch stand jedoch die starke Expression der Transgene in den Linien 7 und 714 (Abschnitt 3.3.1).

Daher wurden, um die jeweilige Kopienzahl der Transgen-Konstrukte pro Mauslinie zu bestimmen, die durch Echtzeit-PCR ermittelten relativen Quantitäten der Kopienzahl des Transgens (Abschnitt 3.1.3.1) für die verschiedenen Linien miteinander verglichen. Zum Vergleich der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linien wurde eine PCR etabliert, die mit dem Primerpaar RT_2_F/RT_3_R einen 241 bp langen Abschnitt stromaufwärts der kodierenden Sequenz der *hSULT1A1* amplifiziert. Zum Vergleich der *hSULT1B1*-transgenen Linien, sowie um die Kopienzahl in diesen Linien mit der in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linien vergleichen zu können, wurde mit dem Primerpaar nPACrep-fw/nPACrep-rev ein 239 bp langer Abschnitt des Vektors, der in beiden Konstrukten der gleiche war, amplifiziert. Da der Vektor vor der Mikroinjektion nicht

entfernt wurde, konnten mit dieser PCR die Kopienzahlen beider Konstrukte relativ zu einander bestimmt werden.

Tabelle 4: Verhältnisse der relativen Transgen-Kopienzahlen der sechs transgenen Linien. A/B entspricht dem Mittelwert aller in n Experimenten ermittelten Kopienzahl-Verhältnisse der Linien A und B. n entspricht der Zahl der Experimente, in denen die Kopienzahl von A und B auf derselben Platte ermittelt wurde.

Linie A	Linie B	Ratio relative		Zahl der
		Kopienzahl A/B	St.abw.	Experimente n =
7	714	1,4	0,3	7
7	633	9,0	3,3	13
7	275	23,0	1,4	2
7	12	9,8	0,9	2
7	5	7,9		1
714	633	6,1	0,6	5
5	275	2,9	0,1	2
5	12	1,3	0,1	3
5	633	1,3		1
12	275	2,1	0,2	5
12	633	1,1	0,1	2
275	633	0,5	0,1	2

Die ermittelten Verhältnisse der Kopienzahlen sind in Tabelle 4 dargestellt. Für alle Linien bis auf Linie 714 (*hSULT1A1/1A2*) konnten definierte Zygotie-Zustände (homo- bzw. hemizygot) miteinander verglichen werden. Bei Linie 714 war dies aufgrund der zwei unterschiedlichen chromosomalen Integrationsorte nicht möglich (Abschnitt 3.2.1). Die Linie mit der niedrigsten Kopienzahl war die *hSULT1B1*-transgene Linie 275. Es folgten die Linien 12 (*hSULT1B1*) und 633 (*hSULT1A1/1A2*) mit jeweils doppelt so vielen Kopien wie Linie 275. In Linie 5 (*hSULT1B1*) konnten dreimal so viele Kopien wie in Linie 275 nachgewiesen werden. Für Linie 7 (*hSULT1A1/1A2*), die Linie mit der höchsten Kopienzahl des Transgens, wurden folgende Kopienzahlverhältnisse zu den anderen Linien ermittelt: 23mal mehr Kopien als Linie 275, neunmal mehr Kopien als Linie 633, zehnmal mehr Kopien als Linie 12 und weniger als doppelt so viele Kopien wie Linie 714. Für Linie 714 lag das Verhältnis zu Linie 633 bei sechs. Setzt man die Kopienzahl für Linie 275 als eins, leiten sich folgende Kopienzahlen für die anderen Linien ab: 2 Kopien für die Linien 12 und 633, 3 Kopien für

Linie 5 und etwa 20 Kopien für Linie 7. Für Linie 714 kann aufgrund des nicht definierten Zygotiestatus keine Aussage getroffen werden.

3.2.2.1 Untersuchung des Genlocus der Transgen-Integration

Durch die Integration des Transgens in das Mausgenom können mauseigene Gensequenzen zerstört werden und ein vom Wildtyp-Hintergrund abweichender Phänotyp der transgenen Mäuse resultieren, der nicht auf der Expression des Transgens beruht. Daher sollte mit molekularbiologischen Methoden und durch Abgleich mit den Sequenzen aus dem Mausgenomprojekt die Integrationsstelle der humanen DNA in den transgenen Linien ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden Genombibliotheken der transgenen Linien erstellt und diese für ein sogenanntes „Genome Walking“ eingesetzt (Abbildung 11). Unter einer Genombibliothek versteht man die mit einem bestimmten Restriktionsenzym vollständig verdaute DNA eines Organismus, bei der in einem zweiten Schritt an jedes der erzeugten Fragmente beidseitig ein Adapter ligiert wurde.

Beim Genome Walking amplifiziert man mittels PCR einen DNA-Abschnitt, in dem eine bekannte Sequenz, in diesem Fall das Transgen-Konstrukt, in eine unbekannte Sequenz, in diesem Fall das Maus-Genom am Integrationsort, übergeht. Die für die PCRs verwendeten Primerpaare bestanden aus einem Vorwärtsprimer und dem entsprechenden „Nested“-Primer, die einem weiter innen liegenden Sequenzabschnitt des Adapters entsprachen, und einem Rückwärtsprimer sowie zugehörigem „Nested“-Primer, die einem Sequenzabschnitt des Transgen-Konstrukts nahe der *SalI*-Schnittstelle, an der das Konstrukt für die Mikroinjektion linearisiert worden war, entsprachen. Das in diesen zwei Amplifikationsschritten gebildete PCR-Produkt sollte den Übergang vom Transgen-Konstrukt ins Mausgenom darstellen. Durch Sequenzierung dieses PCR-Produkts und Abgleich der Sequenz mit der Mausgenom-Datenbank sollte die Maus-DNA-Sequenz stromaufwärts und stromabwärts des Transgen-Konstrukts herausgefunden werden.

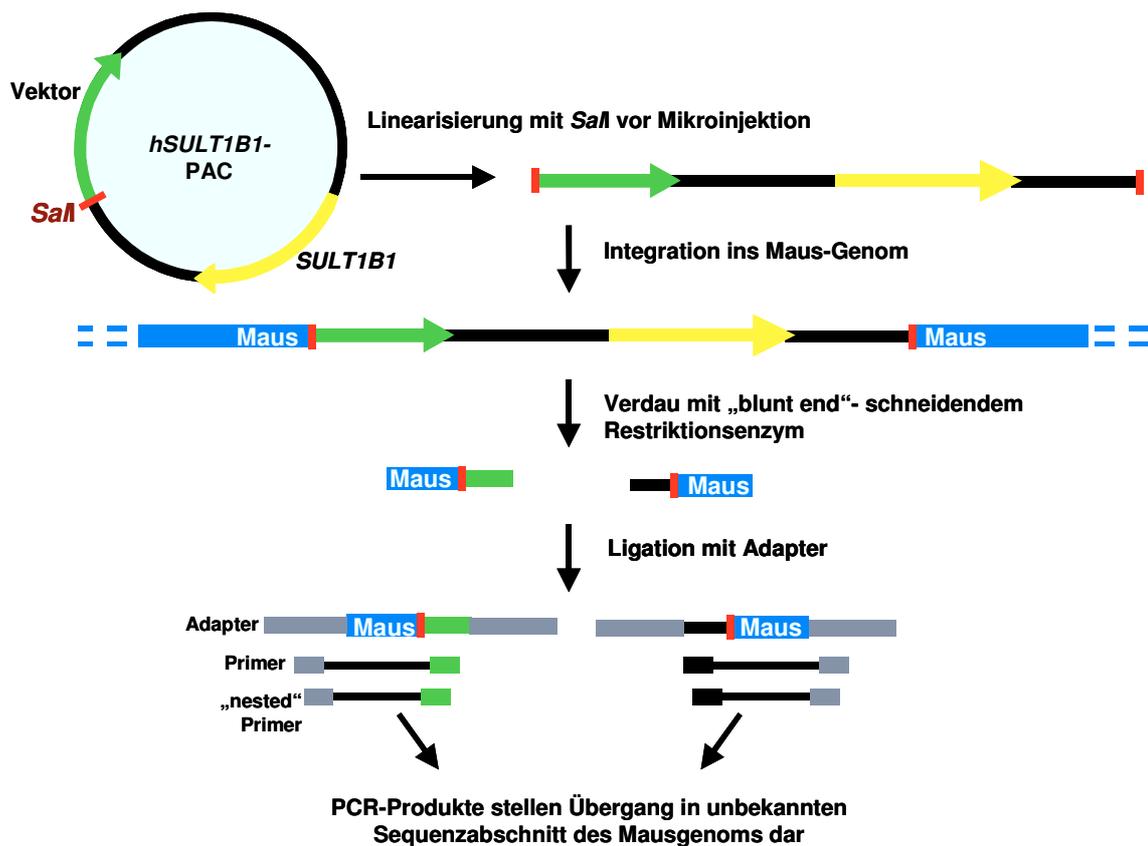


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Methode zum Nachweis des Integrationsortes des *hSULT1B1*-Transgen-Konstrukts (Genome Walking). Es wurde davon ausgegangen, dass sich das *SalI*-geschnittene Konstrukt über die dadurch generierten Sequenzen ins Mausgenom integriert hat. Nach Restriktion mit „blunt end“-schneidenden Endonukleasen, Ligation mit Adapter-Sequenz und PCR sowie „nested“-PCR mit Transgen- und Adapterbasierten Primern sollte eine Sequenz amplifiziert werden, die den Übergangsbereich zwischen Transgen-Konstrukt und Mausgenom darstellt.

Es wurden die Mauslinien 275 (*tg-hSULT1B1*) und 633 (*tg-hSULT1A1/1A2*) mittels Genome Walking untersucht. Diese Linien wurden ausgewählt, da sie die niedrigste (Linie 275) bzw. zweitniedrigste (Linie 633) Kopienzahl des Transgens aufwiesen (Abschnitt 3.2.1.2). In Abbildung 12A sind die Ergebnisse der PCR-Experimente für Linie 275 bei Verwendung einer *Dral*- und einer *PvuII*-Genombibliothek und von Antisense-Primern (SWalk4, -5 und -6), die bezogen auf das PAC-Konstrukt stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle, also im Vektor-Rückgrat liegen, dargestellt. In beiden Bibliotheken trat jeweils nur eine Bande auf, deren Größe entsprechend der Lage des konstruktsspezifischen Primers variierte. Das Auftreten nur einer Bande deutet darauf

hin, dass in dieser Linie nur eine Kopie des Transgen-Konstrukts ins Mausgenom inseriert ist. Die PCR-Produkte beider Bibliotheken (Abbildung 12A: *DraI* und *PvuII*-Bibliotheken) wurden sequenziert. Dabei zeigte sich, dass sie mit dem Sequenzabschnitt des ringförmigen ungeschnittenen *hSULT1B1*-PAC-Konstrukts identisch waren. Eine PCR mit stromaufwärts und stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle definierten Vorwärts-(BWalk4)- und Rückwärts-(SWalk4)-Primern (Abbildung 12B) ergab bei Linie 275 ein PCR-Produkt der entsprechenden Sequenz und bestätigte damit das Resultat der Sequenzierung. Die PCR mit diesen Primern ergab auch mit der DNA der beiden weiteren *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien 5 und 12 sowie mit der DNA des ringförmigen *hSULT1B1*-PAC ein PCR-Produkt identischer Größe. Ein solches PCR-Produkt kann bei den transgenen Linien nur auftreten, wenn sich mehrere Kopien hintereinander ins Mausgenom integriert haben oder wenn die Integration nicht an den durch *SalI*-Restriktion generierten Enden stattgefunden hat.

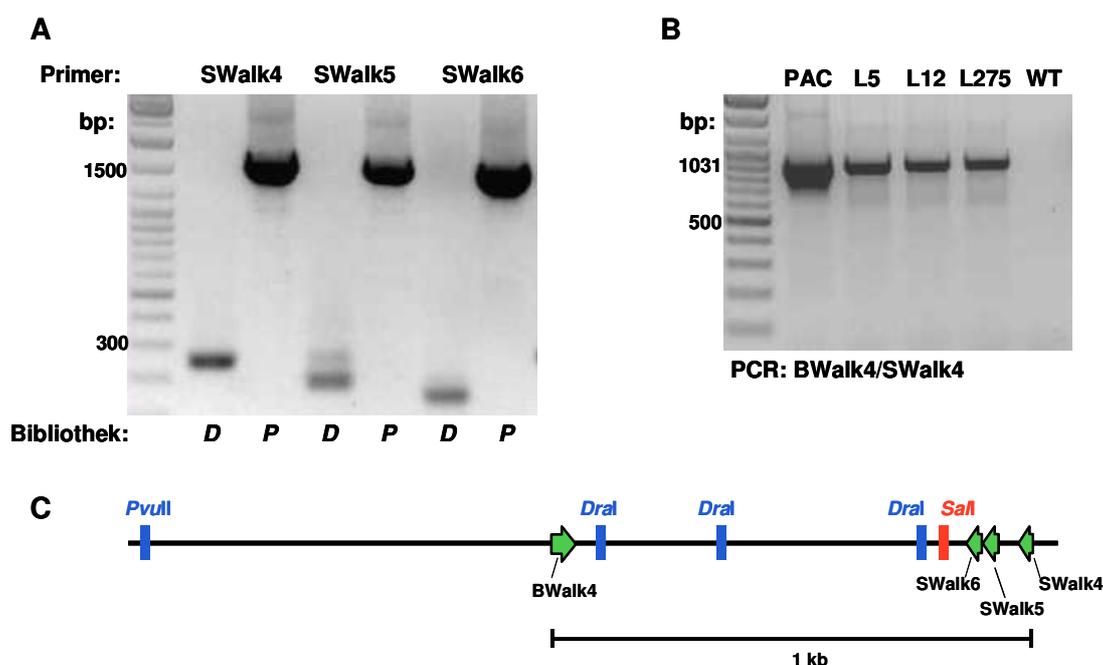


Abbildung 12: Ergebnisse des Genome Walking für die *hSULT1B1*-transgene Linie 275.

A) Ergebnis des Genome Walking mit den *DraI*- und *PvuII*-Bibliotheken der *hSULT1B1*-transgenen Linie 275. Es wurden die Transgen-spezifischen Primer SWalk4, SWalk5 und SWalk6 verwendet. B) Ergebnis einer über die *SalI*-Schnittstelle hinweg laufenden PCR mit den Primern BWalk4 und SWalk4 für das ungeschnittene, *hSULT1B1*-enthaltende Konstrukt (PAC), die drei *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien 5, 12 und 275 sowie für eine Wildtyp-Kontrolle. In jeder der drei Mauslinien ist die über *SalI* hinweglaufende Sequenz vorhanden. C) Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer im Verhältnis zur *SalI*-Schnittstelle im *hSULT1B1*-enthaltenden Konstrukt. *D*: *DraI*-Bibliothek, *P*: *PvuII*-Bibliothek, SWalk4, 5, 6 und BWalk4: verwendete Primer stromaufwärts und stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle.

Es kann daher geschlossen werden, dass die Integration des Transgen-Konstrukts ins Mausgenom nicht, wie ursprünglich angenommen, über die durch den *SalI*-Verdau generierten Enden des linearisierten Konstrukts stattgefunden hat.

Für die *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linien wurde ebenfalls eine PCR mit Primern, die stromaufwärts und stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle des ringförmigen Konstrukts binden, durchgeführt (Abbildung 13A). Bei Linie 7, die Linie deren Kopienzahl des Transgens mittels Echtzeit-PCR auf ungefähr 20 eingeschätzt wurde, waren drei unterschiedliche PCR-Produkte zu erkennen. Die kleinste Bande entspricht mit etwa 330 bp dem ungeöffneten Zustand des ringförmigen Transgen-Konstrukts. Die größeren Banden stellen demnach höchstwahrscheinlich von diesem Zustand abweichende Übergänge von Konstrukt zu Konstrukt dar. Auch bei Linie 714 war das PCR-Produkt nachweisbar, das dem ringförmigen Konstrukt entspricht, während es bei Linie 633 fehlte. Bei Verwendung von PCR-Primern, die weiter stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle lagen, wurden mit Linie 633 jedoch PCR-Produkte erhalten (Abbildung 13E). Diese PCR-Produkte waren etwa 200 bp kürzer als die PCR-Produkte derselben PCR mit dem ringförmigen Transgen-Konstrukt als Matrize (Abbildung 13D). Das Vorhandensein eines solchen verkürzten Konstrukt-Konstrukt-Übergangs wurde durch die Ergebnisse des Genome Walking mit Linie 633 bestätigt. Die Sequenzen der PCR-Produkte mit der Bezeichnung B (Abbildung 13B) stellten diesen verkürzten Übergang dar. Bei ihm fehlt im Vergleich zum ringförmigen Transgen-Konstrukt ein Abschnitt von 196 bp, der vier Nukleotide stromaufwärts der *SalI*-Erkennungssequenz beginnt.

Beim Genome Walking mit den Genom-Bibliotheken der Linie 633 wurde mit zwei der verwendeten Genombibliotheken mehr als ein PCR-Produkt erzeugt (Abbildung 13B, *EcoRV*- und *PvuII*-Bibliothek). Da Linie 633 doppelt so viele Transgen-Kopien wie Linie 275 besitzt (Abschnitt 3.2.2), können diese Banden unterschiedliche Übergänge der Transgen-Konstrukte in zu ermittelnde Sequenzbereiche darstellen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte mit den Bezeichnungen A, C und D der Abbildung 13B und der PCR-Produkte mit der Bezeichnung A der Abbildung 13C brachte folgende Ergebnisse:

Die Sequenz aller PCR-Produkte mit der Bezeichnung A stellte einen Übergang in einen zehn Kilobasen langen Abschnitt des Genoms von *E. coli* dar, der über *SalI*-Erkennungsstellen in die Konstrukt-Sequenz integriert vorlag. Die Sequenz des PCR-Produkts mit der Bezeichnung C entsprach, bezogen auf das ringförmige PAC-

Konstrukt, einem Übergang von dem Abschnitt direkt stromaufwärts der *SalI*-Schnittstelle zu einem Bereich 17,6 kb stromabwärts dieser Schnittstelle. Das PCR-Produkt mit der Bezeichnung D entsprach, bezogen auf das ringförmige PAC-Konstrukt, einem Übergang von dem Abschnitt direkt stromaufwärts der *SalI*-Schnittstelle zu einem Bereich 25,2 kb stromabwärts der Schnittstelle. Dieser Abschnitt lag in entgegengesetzter Orientierung zum Abschnitt stromaufwärts von *SalI* vor.

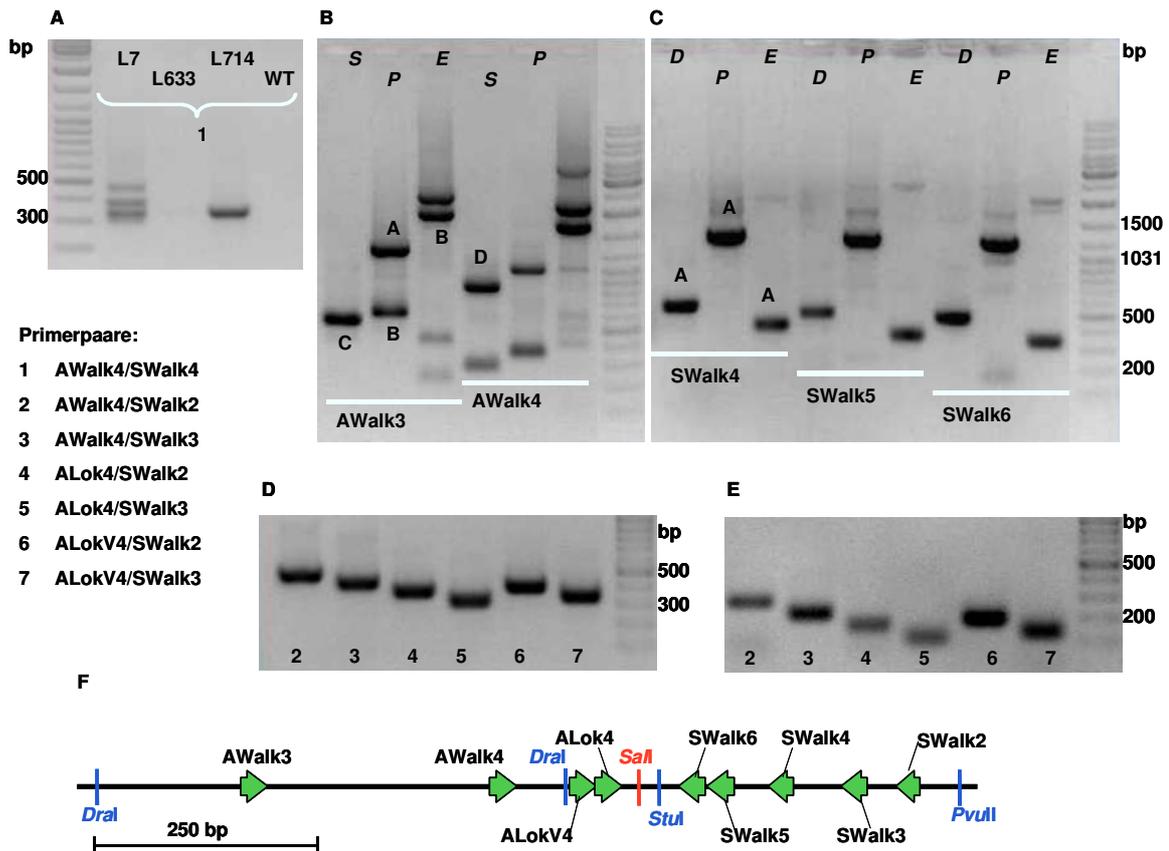


Abbildung 13: Ergebnisse des Genome Walking für die *hSULT1A1/1A2*-transgene Linie 633. A) Ergebnis einer über die *SalI*-Schnittstelle hinweg laufenden PCR mit den Primern AWalk4 und SWalk4 für die drei *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien 7, 633 und 714 sowie für eine Wildtyp-Kontrolle. B+C) Ergebnis des Genome Walking mit den Genom-Bibliotheken der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 633. Es wurden die Transgenspezifischen Primer AWalk3 und AWalk4 (B) sowie SWalk4, SWalk5 und SWalk6 (C) verwendet. D+E) Ergebnisse von über die *SalI*-Schnittstelle hinweg laufenden PCRs für das *hSULT1A1/1A2*-enthaltende Konstrukt (D) und für die *hSULT1A1/1A2*-transgene Mauslinie 633 (E). F) Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer im Verhältnis zur *SalI*-Schnittstelle in einem Ausschnitt des *hSULT1A1/1A2*-enthaltenden Konstrukts. S: *StuI*-Bibliothek, P: *PvuII*-Bibliothek, E: *EcoRV*-Bibliothek, D: *DraI*-Bibliothek; A, B, C, D: jeweils DNA-Fragmente, deren Sequenzen (bis auf Fragmentgrößenunterschiede aufgrund verschiedener Primer) übereinstimmen.

Sowohl beim Genome Walking mit den Genombibliotheken der Linie 275 als auch mit denen der Linie 633 konnte in keinem der sequenzierten PCR-Fragmente eine Sequenz aus dem Mausgenom identifiziert werden.

3.3 Proteinbiochemische Charakterisierung

3.3.1 Immunblot-Analyse der hSULT-Expression in den transgenen Mauslinien

Die heterologe Expression der *SULT*-Gene in den verschiedenen transgenen Mauslinien wurde in Immunblots nachgewiesen. Dazu wurden zytosolische Fraktionen verschiedener Gewebe der Mäuse durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antisera inkubiert (Abschnitt 3.2.2.3). Die Detektion der Expression der Transgene erfolgte mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. In *Salmonella typhimurium* TA1538 rekombinant exprimierte humane und murine SULT-Formen standen als Standards für die immunologische Detektion zur Verfügung.

3.3.1.1 Transgen-Expression in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien

Zum Nachweis der humanen SULT1A1 und SULT1A2 wurden drei verschiedene Antisera eingesetzt, die unterschiedliche Spezifitäten und Sensitivitäten bezüglich der humanen SULT1A-Formen aufweisen. Das Antiserum A (SHARP *et al.* 1995) detektiert die humanen SULT1A1-, 1A2- und 1A3-Formen. Bei der Herstellung des Antisera B (RUBIN *et al.* 1996) wurde ein 14 Aminosäuren langes Peptid aus der Aminosäuresequenz der humanen SULT1A1 verwendet. Dieses Antiserum erkennt sehr spezifisch die humanen SULT1A1 und -1A2, nicht aber SULT1A3. Es ist jedoch weniger sensitiv als Antiserum A. Das Antiserum C (Abteilung ETOX, DIfE, Deutschland) ist sehr sensitiv gegenüber den humanen SULT1A1 und SULT1A3, jedoch nicht gegenüber der humanen SULT1A2. Zur Entwicklung der Blots wurde jedes der drei Antisera nacheinander eingesetzt. Zwischen den Entwicklungen wurde der vorherige Antikörper von der Blotmembran abgewaschen. Da mit allen drei Antisera sehr ähnliche Ergebnisse erzielt wurden und keines der Sera nennenswerte Kreuzreaktivitäten mit der murinen Sult1a1 aufwies, wurde das jeweils aussagekräftigste Bild zur Darstellung herangezogen.

Für die *hSULT1A1/1A2*-transgene Mauslinie 7 konnte eine starke Expression beider humaner Proteine in Leber, Niere, Lunge und den Darmabschnitten Jejunum,

Ileum, Caecum und Kolon nachgewiesen werden (Abbildung 14). In Magen und Duodenum wurde keine Expression der Transgene detektiert. Weiterhin wurde die Expression von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Gehirn, Milz, Pankreas und Uterus nachgewiesen, nicht jedoch in Haut und Harnblase (nicht dargestellt). In Leber, Niere und Lunge sowie den die humanen SULT1A1 und SULT1A2 exprimierenden Darmabschnitten der transgenen Linie 7 war die Expression der hSULT1A1 deutlich stärker als in den entsprechenden humanen Geweben (Abbildung 15).

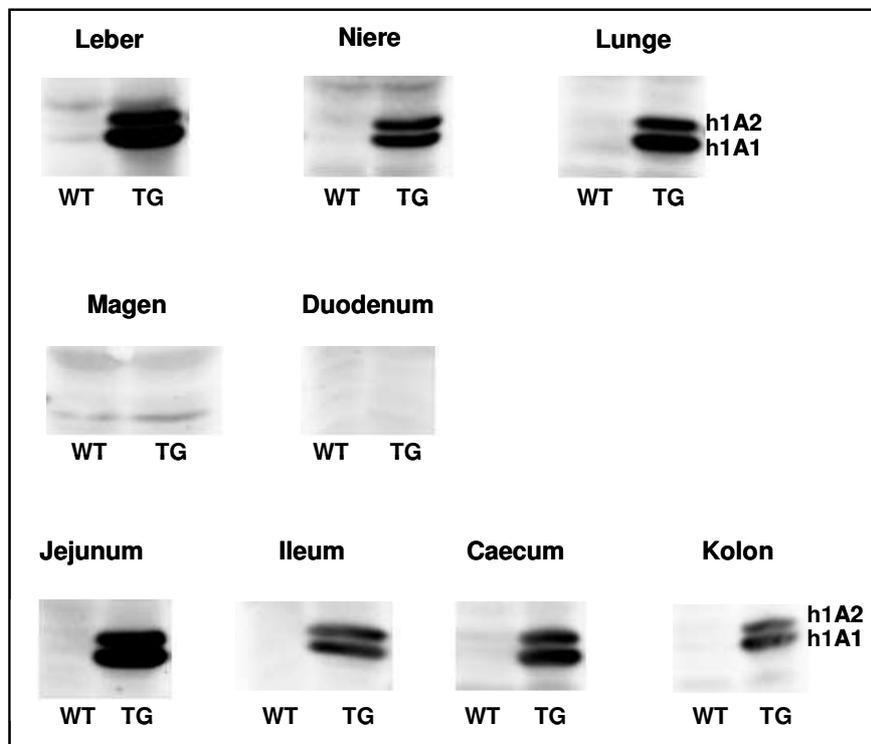


Abbildung 14: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen einer transgenen Maus der Linie 7. Detektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 mit dem Antiserum B in den zytosolischen Fraktionen verschiedener Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 7 sowie einer Wildtyp-Maus des Inzuchtstammes FVB/N (Wildtyp). Beide Tiere waren weiblich und 9 Wochen alt. Die verwendeten Proteinmengen waren für Kolon 90, für Leber 150 und für alle weiteren Gewebe 300 µg. TG: Zytosol einer transgenen Maus der Linie 7; WT: Zytosol einer Wildtyp-Maus; Standards: h1A1: hSULT1A1; h1A2: hSULT1A2.

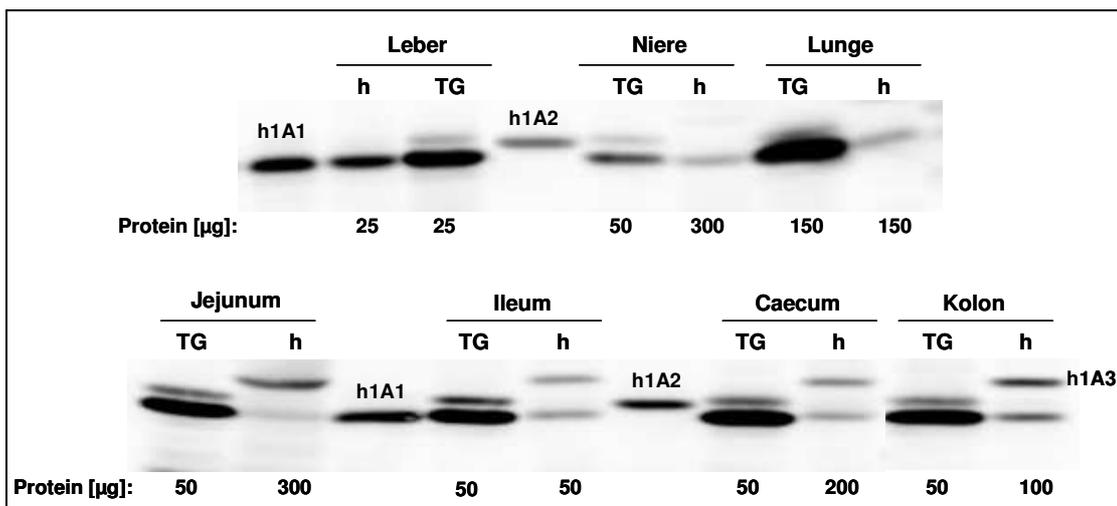


Abbildung 15: Immunodetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 7 und Vergleich mit der Immunodetektion in Zytosolpräparationen humaner Gewebe. Die untersuchte Maus war neun Wochen alt und weiblich. Zur Detektion wurde das Antiserum C verwendet, welches in den humanen Zytosolen des Gastrointestinaltrakts zusätzlich die hSULT1A3 detektiert. TG: Zytosol einer transgenen Maus der Linie 7; h: humanes Zytosol; Standards: h1A1: hSULT1A1; h1A2: hSULT1A2; h1A3: hSULT1A3.

Durch Immunblots mit Titrationsreihen konnte die Proteinmenge ermittelt werden, bei deren Verwendung sich die Bandenstärken der Gewebezytosole der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 und der Standards so ähnlich waren, dass der bei Entwicklung und Exposition der Blots auftretende Fehler als gering eingestuft werden konnte (Diplomarbeit N. Schade). So konnte für verschiedene Gewebe hemizygoter Mäuse der transgenen Linie 7 der Anteil der hSULT1A1 und der hSULT1A2 an der Gesamtmenge des zytosolischen Proteins gemessen werden. Dieser lag für die hSULT1A1 in der Leber bei etwa 4,3%, in der Niere bei etwa 1,2%, in der Lunge bei etwa 0,5%, im Jejunum bei etwa 1,9% und im Kolon bei etwa 0,9%. Der Anteil der humanen SULT1A2 an der Gesamtmenge zytosolischen Proteins lag in der Leber bei 0,7%, in der Niere bei 0,3%, in der Lunge bei 0,1%, im Jejunum bei 0,5% und im Kolon bei 0,3%. Damit wurde die hSULT1A1 in den Leber der transgenen Mäuse etwa sechsmal, in der Niere etwa fünfmal, in Lunge und Jejunum etwa viermal und im Kolon etwa dreimal stärker exprimiert als die humane SULT1A2.

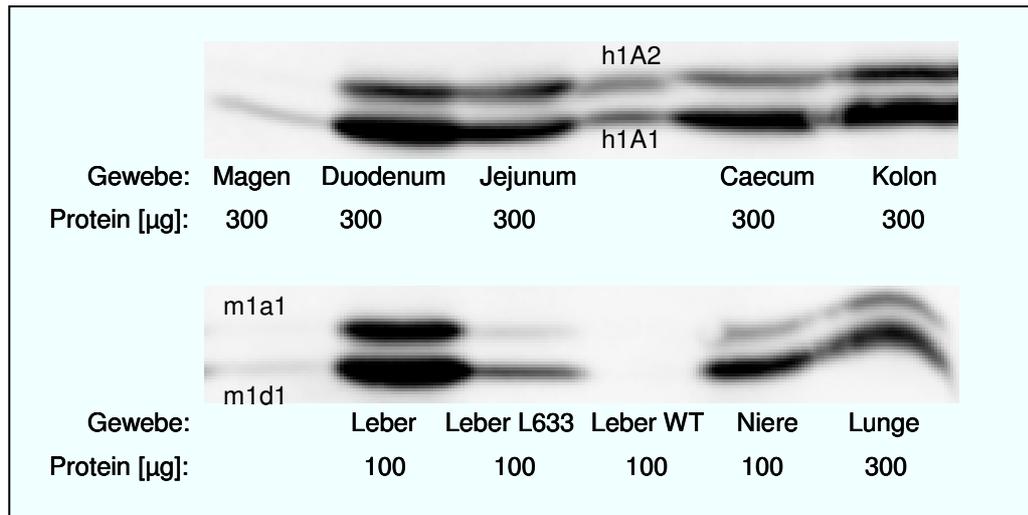


Abbildung 16: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 714. Das untersuchte Tier war männlich und acht Wochen alt. Es wurde das Antiserum B verwendet. Als Standards dienten die heterolog exprimierte humanen SULT1A1 (h1A1) und SULT1A2 (h1A2) sowie die murinen Sult1a1 (m1a1) und Sult1d1 (m1d1). Für die Leber erfolgte ein Vergleich mit der Expression in der tg-Linie 633 (siehe auch Abbildung 18). WT: Zytosol einer Wildtyp-Maus.

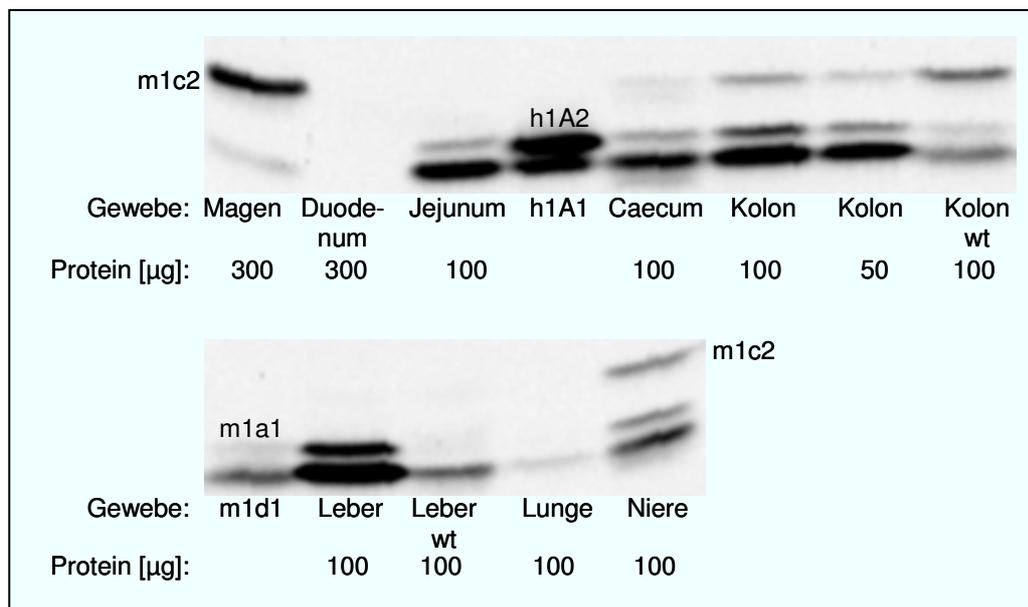


Abbildung 17: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 633. Das untersuchte Tier war sechs Wochen alt und weiblich. Es wurde das Antiserum A verwendet, das auch die murine Sult1c2 (m1c2) detektiert. Als Standards dienten die heterolog exprimierte humanen SULT1A1 (h1A1) und SULT1A2 (h1A2) sowie die murinen Sult1a1 (m1a1) und Sult1d1 (m1d1). WT: Zytosol einer Wildtyp-Maus.

Bei der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 (Abbildung 16) wurde die Expression der Transgene in Duodenum, Jejunum, Caecum und Kolon sowie in Leber, Niere und Lunge nachgewiesen. Im Magen lag die Expression der *hSULT1A1* an der Nachweisgrenze und eine Expression der *hSULT1A2* konnte nicht detektiert werden. In der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinie 633 (Abbildung 17) wurde die Expression der Transgene in Leber, Niere, Jejunum, Caecum und Kolon nachgewiesen. Die humanen Proteine wurden nicht in Magen, Duodenum und Lunge detektiert.

Die *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien wurden hinsichtlich der Expressionsstärke der humanen Proteine in Leber und Kolon verglichen (Abbildung 18). Die höchste Intensität wurde bei Linie 7 detektiert. Sie exprimiert die Transgene etwas stärker (Faktor 1,1 für die Leber, Faktor 1,5 für das Kolon) als Linie 714, und deutlich stärker (Faktor 15 für die Leber, Faktor 17 für das Kolon) als Linie 633. Die Expressionsstärke korreliert folglich mit dem ermittelten Verhältnis der Kopienzahl des Transgen-Konstrukts (Abschnitt 3.2.2) in den unterschiedlichen *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linien.

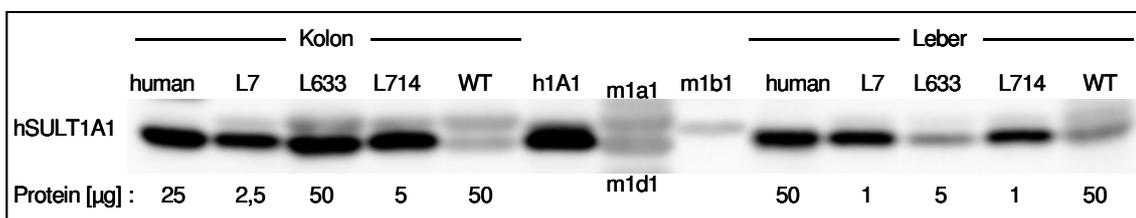


Abbildung 18: Immundetektion von hSULT1A1 in Zytosolpräparationen von Kolon und Leber hemizygot transgener Mäuse der Linien 7, 633 und 714 zum Vergleich der Expressionsstärke in den drei Linien. Untersucht wurden Zytosole von männlichen Tieren (Alter: 8 Wochen für Linien 7 und 714 sowie Wildtyp, 16 Wochen für Linie 633). Es wurde das Antiserum C verwendet. Zum Vergleich mit der Expressionsstärke im Menschen wurde je ein humanes Zytosol aufgetragen. Als Standards dienten die heterolog exprimierte humanen SULT1A1 (h1A1) und SULT1A2 (h1A2) sowie die murinen Sult1a1 (m1a1) und Sult1d1 (m1d1). WT: Zytosol einer Wildtyp-Maus.

3.3.1.2 Transgen-Expression in den *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien

Zur Detektion der humanen SULT1B1 in den Gewebezytosolen der drei *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien 12, 275 und 5 wurden zwei unterschiedliche spezifische Antiseren, „1B2r“ (WANG *et al.* 1998) und „1B1s“ (Coughtrie, Dundee, Schottland) verwendet. Bei allen Blots wurden beide Antiseren nacheinander eingesetzt.

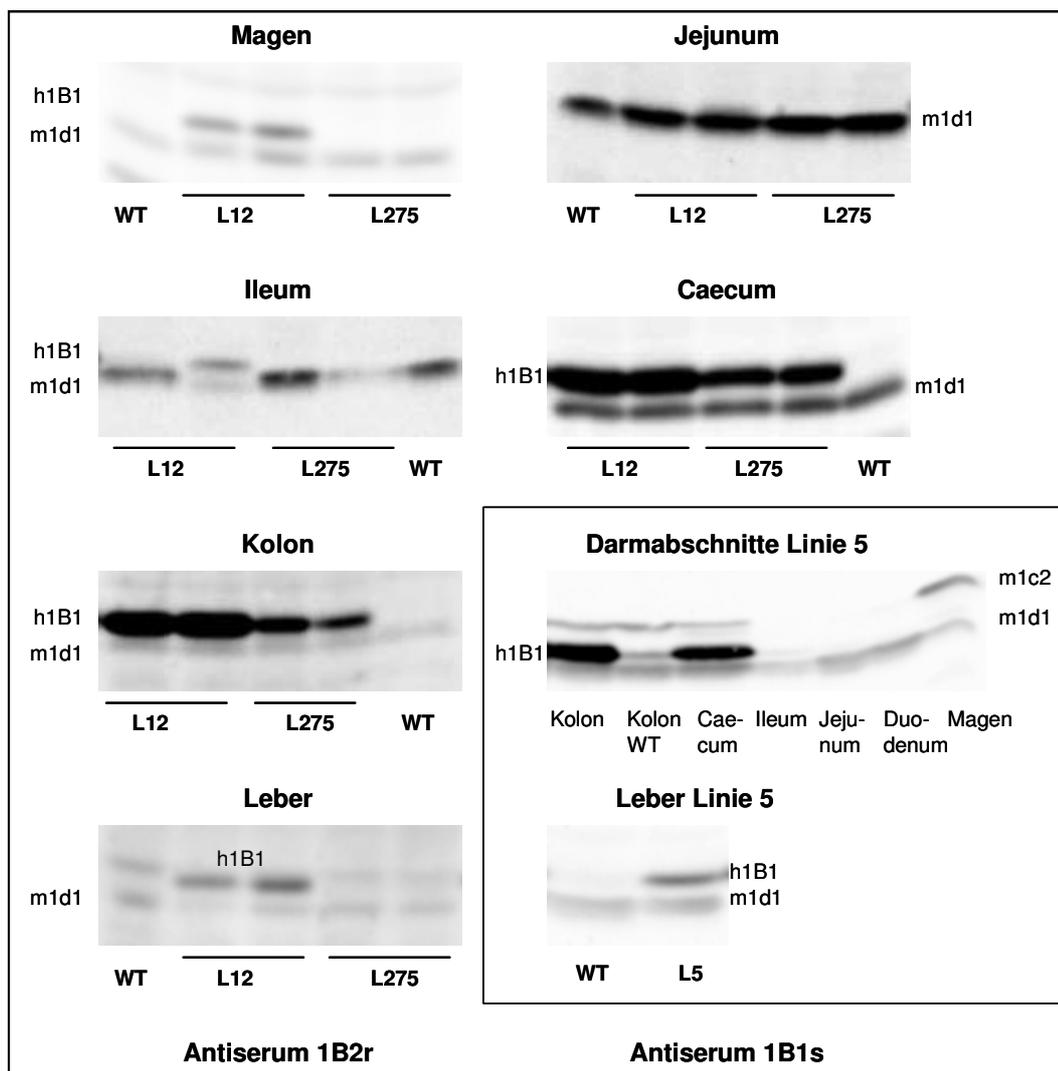


Abbildung 19: Immundetektion von hSULT1B1 in zytosolischen Fraktionen verschiedener Gewebe hemizygot transgener Mäuse der Linien 12, 275 und 5. Untersucht wurden zwei 12 Wochen alte Tiere der Linie 12 (männlich und weiblich), zwei sechs Wochen alte Tiere der Linie 275 (männlich und weiblich) und ein sechs Wochen altes, weibliches Tier der Linie 5. Es wurden die Antiseren 1B2r (linke Seite) und 1B1s (rechte Seite) verwendet. Die Detektion für Linie 12 und 275 erfolgte in gemeinsamen Blots, als beide Linien die Filialgeneration 1 erreichten. Linie 5 wurde erst später etabliert und daher einzeln geblottet. Bei den Geweben der Linien 12 und 275 sind jeweils die Zytosole zweier Tiere nebeneinander geblottet worden (männliches Tier links, weibliches rechts). Es wurden 300 µg Zytosol eingesetzt; Ausnahmen: Linie 5, Caecum: 200 µg, Linie 5, Leber: 150 µg. WT (Wildtyp): Zytosol einer Wildtyp-Maus (weiblich, neun Wochen alt), Standards: h1B1: humane SULT1B1; m1d1, m1c2: murine Sult1d1 und Sult1c2.

Mit beiden Antiseren wurden sehr ähnliche Ergebnisse erzielt. Bei jeder der drei *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien (Abbildung 19) wurde eine starke Expression des humanen Proteins in Caecum und Kolon detektiert. Bei Linie 12 konnte eine schwache Expression der *hSULT1B1* im Magen nachgewiesen werden, für die Linien 275 und 5 war keine Expression im Magen nachweisbar. Nur bei Linie 5 wurde das Duodenum untersucht, wo ebenfalls keine Expression der *hSULT1B1* nachweisbar war.

Das Transgen wurde bei keiner der drei Linien im Jejunum exprimiert. Im Ileum der Linie 12 war bei einem der beiden Tiere, deren Zytosole untersucht wurden, eine schwache Expression nachweisbar, im Ileum der Linien 275 und 5 wurde keine Expression des Transgens gefunden. In der Leber der Linien 5 und 12 wurde das Transgen schwach, bei Linie 275 sehr schwach exprimiert. Zum Vergleich der Expressionsstärke der *hSULT1B1* im Kolon der transgenen Maus und des Menschen wurden humanes Kolon-Zytosol und Kolon-Zytosol einer Maus der Linie 12 nebeneinander geblottet. Dabei wurden für Maus und Mensch alternierend jeweils gleiche Proteinmengen in abnehmender Quantität eingesetzt (Abbildung 20). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke im Kolon der transgenen Maus der Expressionsstärke im humanen Kolon entspricht.

Um die Expressionsstärke in Kolon und Leber der drei *hSULT1B1*-transgenen Linien miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Zytosole nebeneinander geblottet (Abbildung 21). Die Expression im Kolon war bei den Linien 12 und 5 etwa gleich stark, in der Linie 275 hingegen deutlich niedriger. Auch in der Leber war die Expressionsstärke der Linien 12 und 5 etwa gleich, während in der Linie 275 nahezu keine *hSULT1B1*-Expression gefunden wurde.

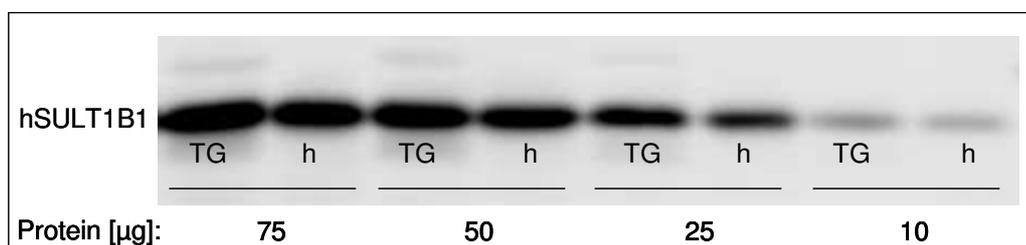


Abbildung 20: Vergleich der *hSULT1B1*-Expressionsstärke im Kolon einer hemizygot transgenen Maus der Linie 12 mit einer humanen Probe. Es wurde das Antiserum 1B1s eingesetzt. TG: Zytosol einer transgenen, 12 Wochen alten, männlichen Maus der Linie 12; h: humanes Zytosol.

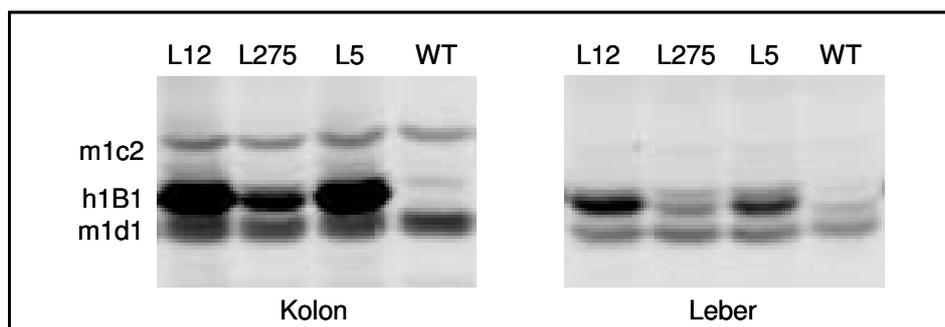


Abbildung 21: Vergleich der Expressionsstärke der hSULT1B1 im Kolon und in der Leber der hemizygoter Mäuse der transgenen Linien 12, 275 und 5. Die untersuchten Tiere waren acht Wochen alt und männlich. Es wurde das Antiserum 1B1s verwendet. Es wurden jeweils 100 µg Kolon-Zytosol und 200 µg Leber-Zytosol eingesetzt. WT: Kolon-Zytosol einer Wildtyp-Maus.

3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation der SULT-Expression

Der immunhistochemische Nachweis der Transgen-Expression an Gewebeschnitten erfolgte analog zur Immunblot-Analyse mit für die entsprechenden SULT-Formen spezifischen Antiseren. Die zelluläre bzw. subzelluläre Lokalisation der Antikörperbindung wurde mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zellen mit Immunreaktivität stellten sich in den Gewebeschnitten braun dar. In keinem der Schnittpräparate der nicht-transgenen Kontrolltiere (Abbildungen 22D-27D, 28A, 29A) lag eine Anfärbung vor, so dass eine Kreuzreaktivität mit mauseigenen Proteinen ausgeschlossen werden konnte.

3.3.2.1 hSULT1A1-Expression in Gewebeschnitten der *hSULT1A1/1A2*-tg Linie 7

Zur Detektion der Transgen-Lokalisation in Gewebeschnitten der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 wurde das Antiserum C verwendet, welches die hSULT1A1 und -1A3, jedoch nur schwach die hSULT1A2 detektiert. Es wurden Leber, Niere, Lunge, Pankreas, Jejunum und Kolon immunhistochemisch untersucht. Für das Kolon erfolgte zusätzlich ein Vergleich mit humanem Kolongewebe.

In der Leber (Abbildung 22) wurden die humane SULT1A1 sowohl zytosolisch als auch kernständig detektiert. Die Immunfärbung der Hepatozyten war innerhalb des Azinus homogen. Das Gallengangepithel war ebenfalls positiv.

Auch in der Niere (Abbildung 23) wurde die hSULT1A1 sowohl zytosolisch als auch kernständig detektiert. Im inneren Nierenmark trat keine Immunfärbung auf. Im

äußeren Nierenmark und im inneren Cortex lag hingegen der bereits makroskopisch erkennbare Bereich intensivster Immunfärbung in der Niere vor. Im äußeren Nierenmark waren die distalen Tubuli angefärbt. Im Cortex zeigten bevorzugt die proximalen Tubuli der juxtamedullären Nephrone eine starke zytosolische und kernständige Immunreaktivität. Im Bereich der oberflächlichen Nephrone waren die Tubuli schwächer immunreaktiv und die zelluläre Lokalisation beschränkte sich hauptsächlich auf die Nuklei. Nierenkörperchen sowie Sammelrohre wiesen keinerlei Immunfärbung auf. In der Lunge (Abbildung 24) war die Expression der hSULT1A1 in den Zellen des respiratorischen Epithels sowohl zytosolisch als auch kernständig ausgeprägt. In den Pneumozyten des Typs II lag eine hauptsächlich kernständige Lokalisation vor. Im exokrinen Pankreas (Abbildung 25) konnte eine Expression der hSULT1A1 im Gangepithel der Ausführungsgänge nachgewiesen werden. Die Inselzellen hingegen waren negativ.

Im Jejunum (Abbildung 26) lagen eine zytosolische und eine kernständige Reaktivität vor, die sich auf die Epithelzellen der Zotten beschränkte. Im Kolon (Abbildung 27) war die Immunreaktivität in den Epithelzellen an dem luminal gelegenen Abschnitt der Krypten am ausgeprägtesten und nahm in Richtung Kryptengrund stark ab, wo ausschließlich die Kerne eine schwache Immunfärbung aufwiesen. Damit entsprach die zelluläre Verteilung der humanen Enzyme in den transgenen Mäusen der Enzymverteilung im humanen Kolon (Abbildung 28B und C). Allerdings war die Anfärbung in den Kolonpräparaten der transgenen Mäuse stärker ausgeprägt als in den Schnitten des humanen Kolons. Dies bestätigte die im Western-Blot nachgewiesene, das humane Niveau übertreffende Expressionsintensität in den transgenen Mäusen der hier untersuchten Linie 7 (Abschnitt 3.3.1).

3.3.2.2 hSULT1B1-Expression im Kolon der *hSULT1B1*-tg Linie 12

Zur Detektion der hSULT1B1 in Gewebeschnitten des Kolons der *hSULT1B1*-transgenen Linie 12 wurde das Antiserum 1B1s verwendet. Die Immunfärbung der hSULT1B1 war, wie die der hSULT1A1 in der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7, in den Epithelzellen in der luminalen Hälfte der Krypten lokalisiert (Abbildung 29B). Damit entsprach sie der Lokalisation der SULT1B1 im humanen Kolon (Abbildung 29C). Die Intensitäten der Immunreaktion bei transgener Maus und Mensch waren einander ähnlich, was die im Western Blot nachgewiesenen, sich gleichenden Expressionsniveaus der hSULT1B1 im Kolon von transgener Maus der Linie 12 und Mensch bestätigte (Abschnitt 3.3.1).

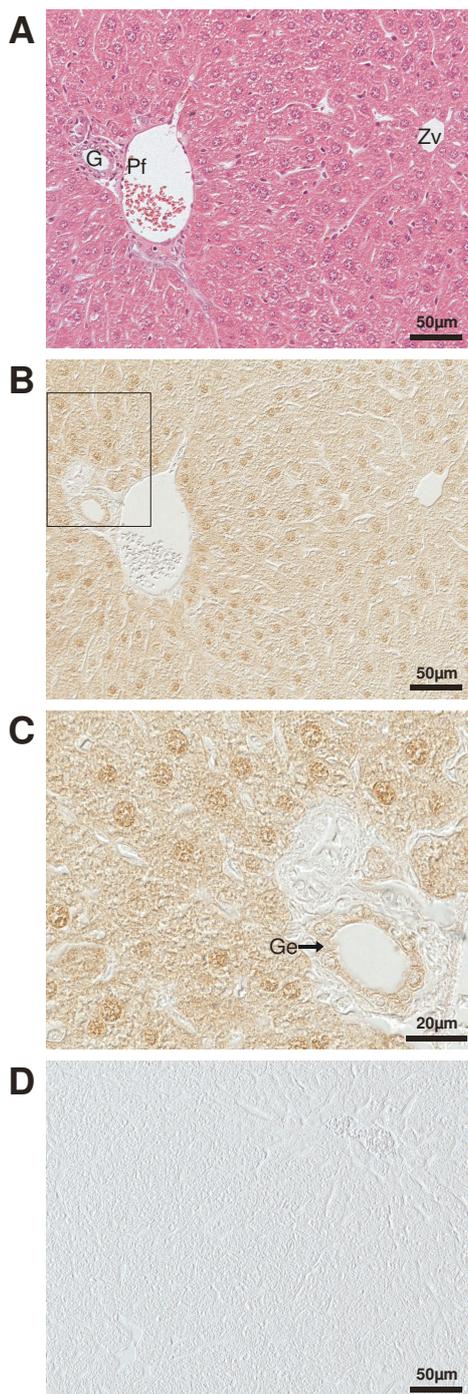


Abbildung 22: Nachweis der hSULT1A1 in der Leber einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. G: Gallengang; Ge: Gallengangepithel; Pf: Portalfeld; Zv: Zentralvene

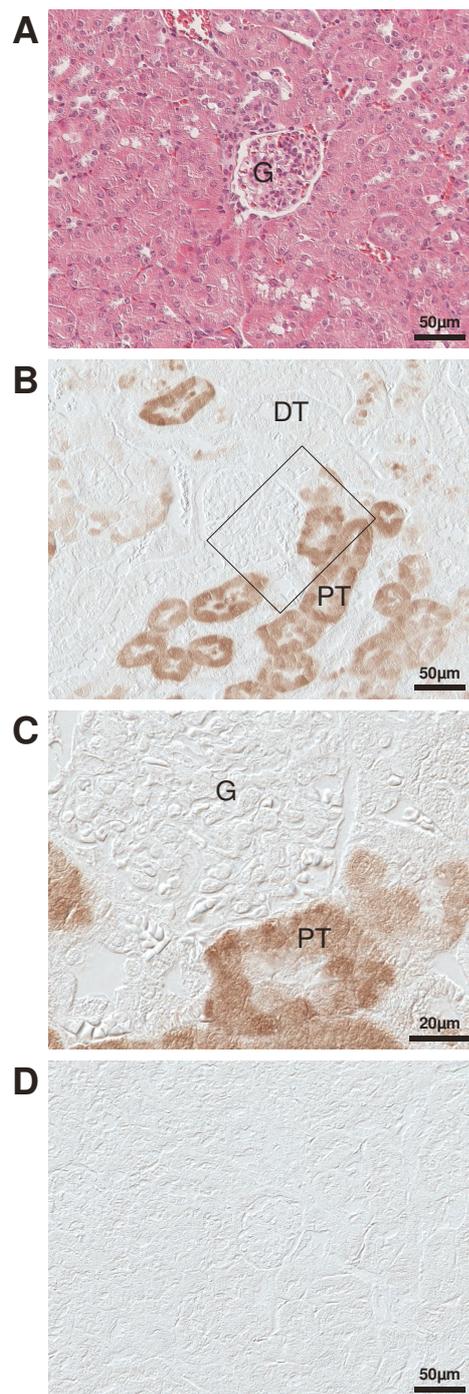


Abbildung 23: Nachweis der hSULT1A1 in der Niere einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. G: Glomerulus; DT: distaler Tubulus; PT: proximaler Tubulus.

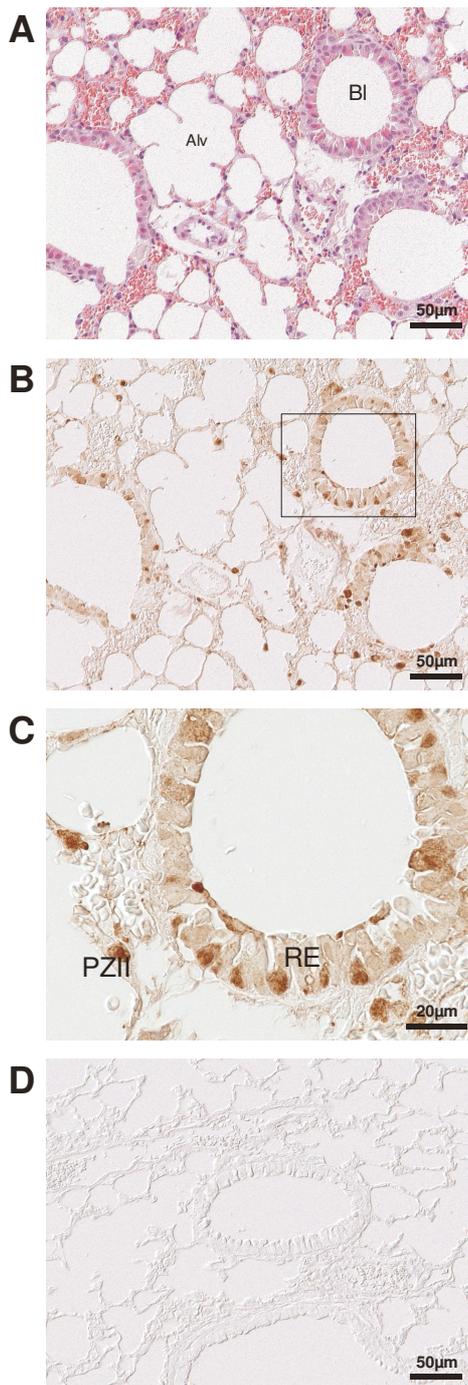


Abbildung 24: Nachweis der hSULT1A1 in der Lunge einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. Alv: Alveole, Bl: Bronchiolus; PZII: Pneumozyt Typ II; RE: respiratorisches Epithel.

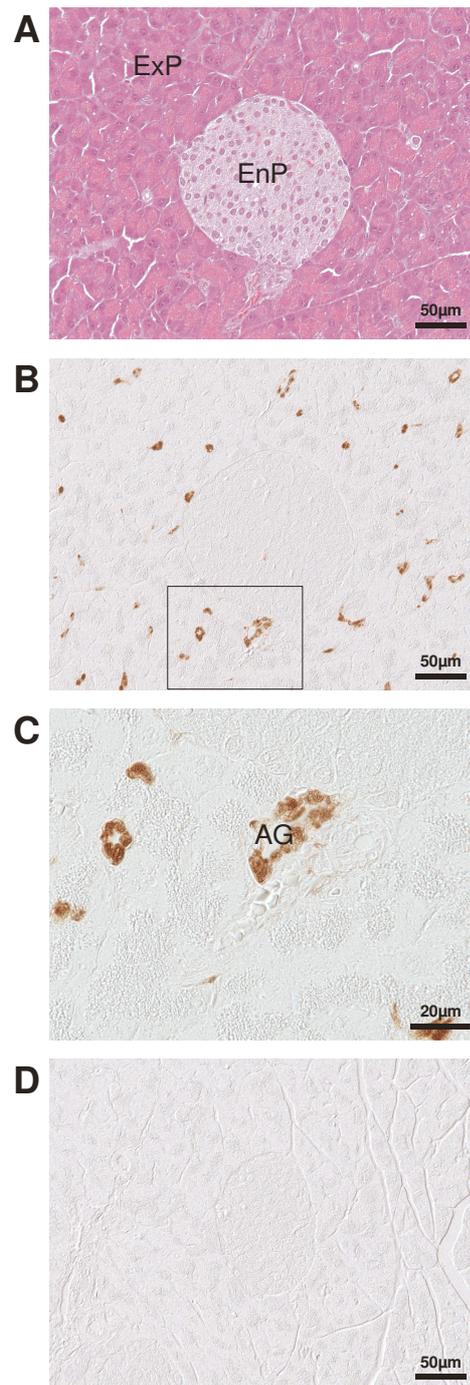


Abbildung 25: Nachweis der hSULT1A1 im Pankreas einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. ExP: exokriner Pankreas; EnP: endokriner Pankreas; AG: Ausführungsgang.

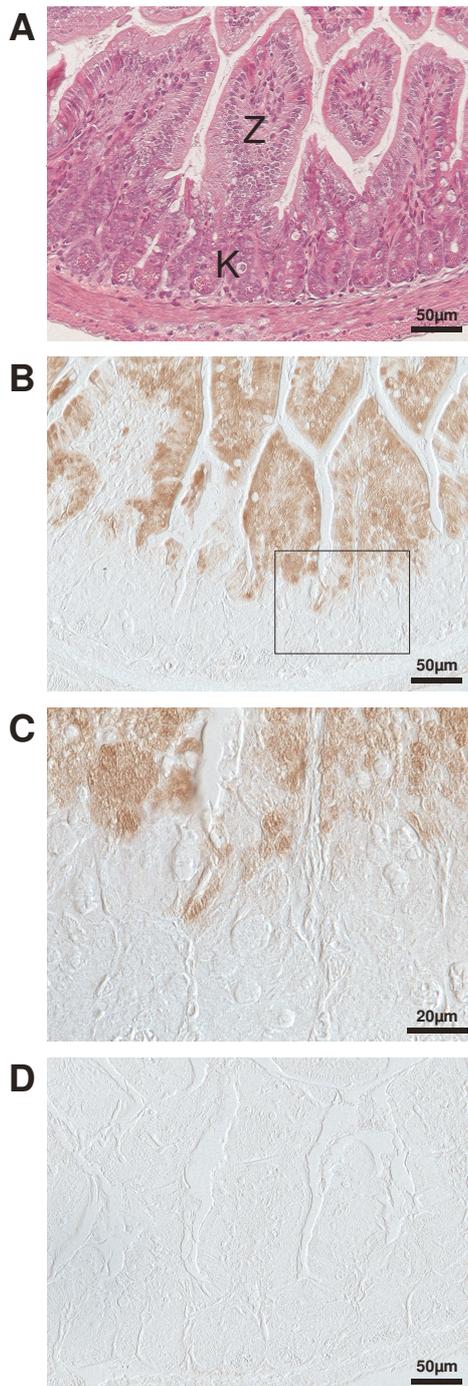


Abbildung 26: Nachweis der hSULT1A1 im Jejunum einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. K: Krypte; Z: Zotte .

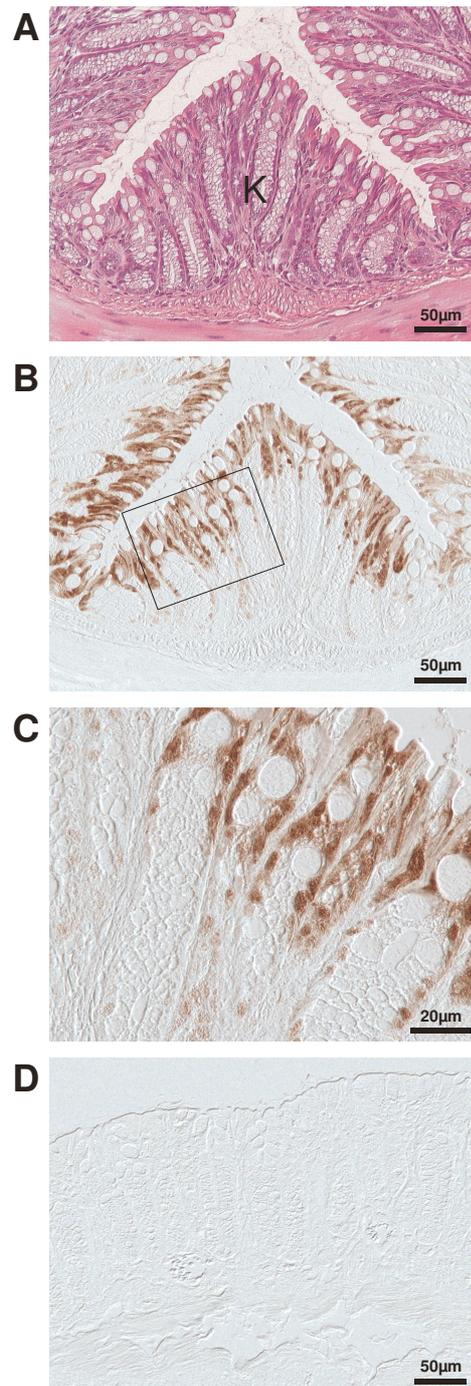


Abbildung 27: Nachweis der hSULT1A1 im Kolon einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D). Es wurde das Antiserum C verwendet. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. K: Krypte.

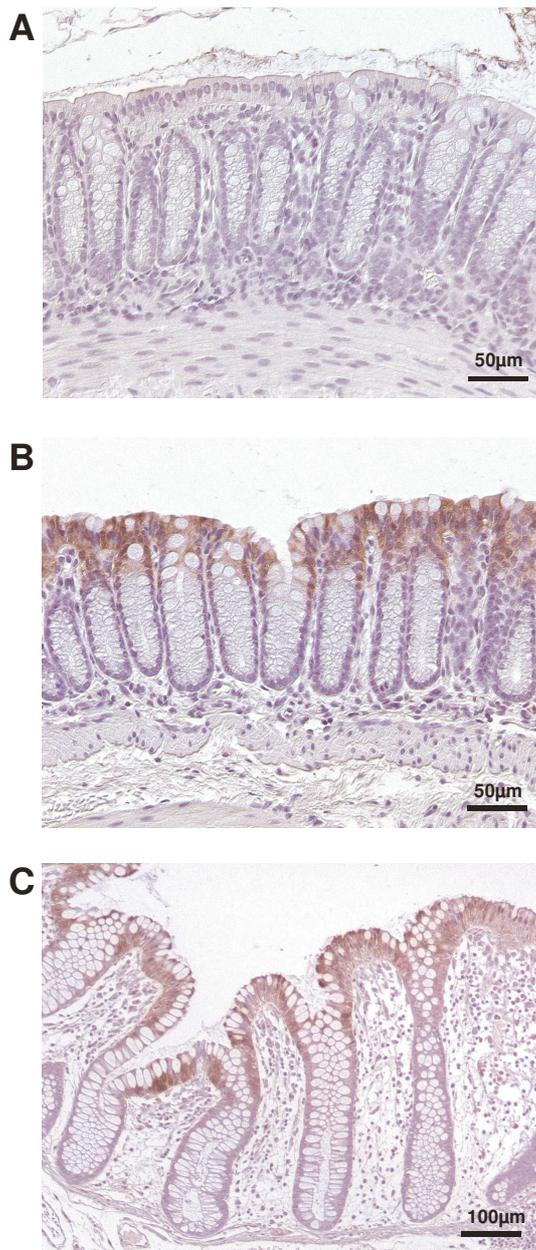


Abbildung 28: Vergleich der Lokalisation der hSULT1A1-Expression im Kolon einer Maus der transgenen Linie 7 (B) und im humanen Kolon (C) sowie Vergleich mit einer nicht-transgenen Maus (A). Es wurde das Antiserum C in 1:20.000facher (A und B) bzw. 1:8.000facher Verdünnung (C) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

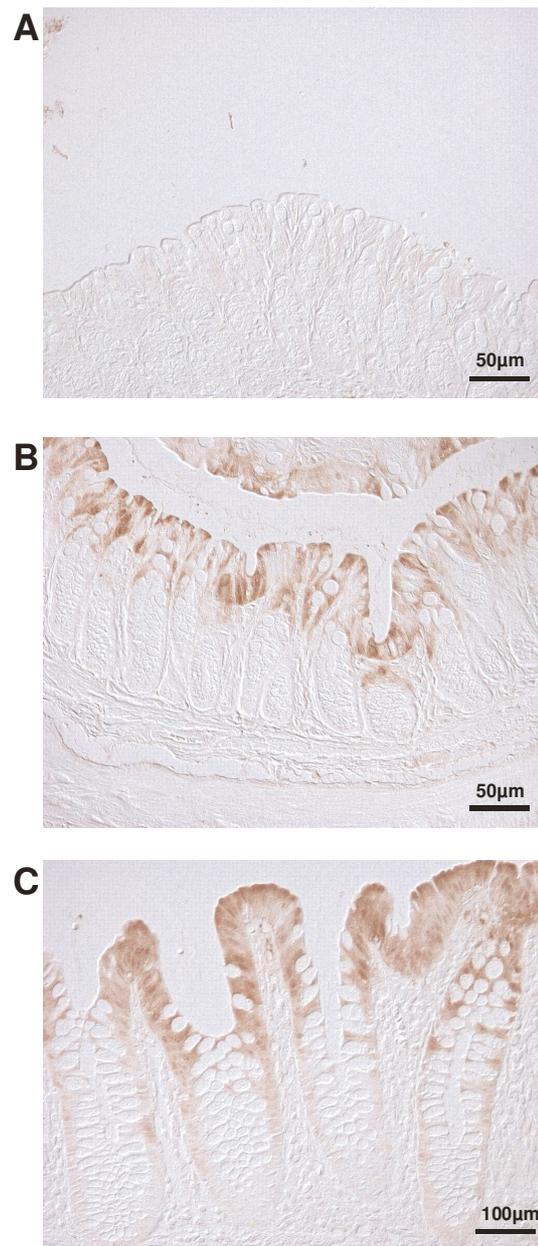


Abbildung 29: Vergleich der Lokalisation der hSULT1B1-Expression im Kolon einer Maus der transgenen Linie 12 (B) und im humanen Kolon (C) sowie Vergleich mit einer nicht-transgenen Maus (A). Es wurde das Antiserum "1B1s" in 1:25.000facher (A und B) bzw. 1:20.000facher Verdünnung (C) verwendet.

3.3.3 Aktivitätsnachweis für das heterolog exprimierte Enzym SULT1A1

Es wurde untersucht, ob die in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen der Linie 7 heterolog exprimierte Proteine enzymatisch aktiv sind. Dazu wurde in einem modifizierten PAP³⁵S-Assay (FOLDES und MEEK 1973) zytosolisches Protein aus Leber und Kolon von transgenen Mäusen sowie von einer Wildtyp-Maus eingesetzt und ermittelt, ob in den Proteinfractionen Aktivität hinsichtlich eines typischen Substrats der humanen SULT1A1 und SULT1A2, 4-Nitrophenol, vorhanden ist.

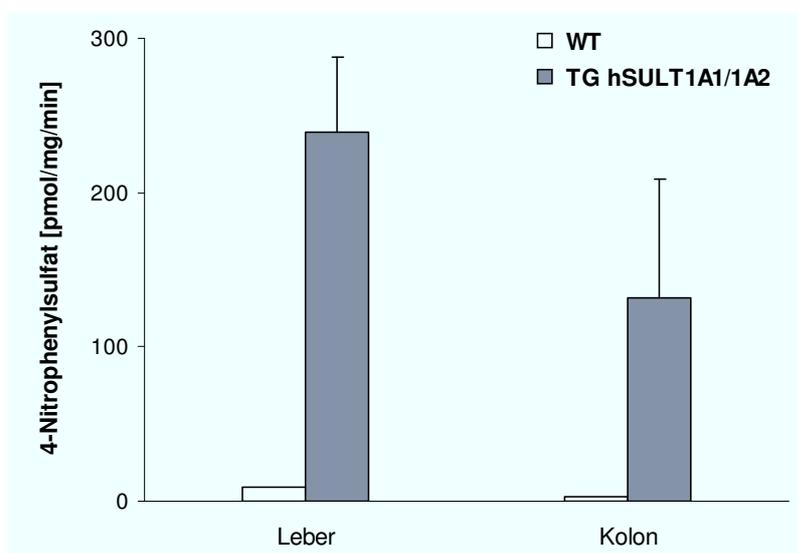


Abbildung 30: Enzymatische SULT1A1/1A2-Aktivität in Leber- und Kolonzytosolen von drei *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen der Linie 7 (TG) und von einer Wildtyp-Maus. Es wurden die Aktivität hinsichtlich des typischen *hSULT1A1* und *-1A2*-Substrats 4-Nitrophenol im PAP³⁵S-Assay untersucht. Für die transgenen Mäuse sind Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die zytosolischen Proteinfractionen aus Leber und Kolon der transgenen Mäuse bei gleicher eingesetzter Gesamtproteinmenge eine deutlich höhere Aktivität hinsichtlich des Substrats 4-Nitrophenol aufwiesen als die entsprechenden Proteinfractionen der Wildtyp-Maus (Abbildung 30). Die Aktivität war in den Leberproben der transgenen Mäuse etwa 30mal, in den Kolonproben etwa 50mal höher als in den entsprechenden Proben des Wildtyp-Tieres. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die heterolog exprimierte Proteine auch *in vivo* enzymatisch aktiv sind.

3.4 Genotoxizitätsexperimente mit *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen

3.4.1 PhIP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen

Das heterozyklische aromatische Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) ist eine der wenigen bekannten Substanzen, die im Kolon von Nagern Tumoren induziert. Seine metabolische Aktivierung im menschlichen Organismus steht möglicherweise mit der hohen Inzidenz von Darmkrebs in der Bevölkerung Europas und den USA in Zusammenhang (Abschnitt 1.1.3.1). Als Modellsystem zur Untersuchung dieses hypothetischen Zusammenhangs sollen die für die humanen *SULT1A1/1A2*-Gene transgenen Mäuse zum Einsatz kommen.

Vor der Durchführung langfristiger Kanzerogenese-Studien stehen Kurzzeit-Genotoxizitätstests, die dazu dienen, Verteilung und genotoxische Wirkung der Substanz in den Geweben der Mäuse beurteilen zu können. In einem solchen Test sollte in dieser Arbeit der Endpunkt PhIP-DNA-Adduktbildung in verschiedenen Geweben, insbesondere im Gastrointestinaltrakt, der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen der Linie 7 untersucht und mit der Adduktbildung in den entsprechenden Geweben nicht-transgener Mäuse des Wildtyp-Stammes FVB/N verglichen werden.

Dazu wurde den Mäusen eine einmalige Dosis von 90 mg (400 µmol) pro kg KG PhIP in wässriger Lösung oral verabreicht. Die Höhe der Dosis orientierte sich an den Ergebnissen von Versuchen, die in einer vorausgegangenen Dissertation mit nicht-transgenen Ratten durchgeführt wurden. Sie entsprach einer Hochdosis innerhalb des linearen Dosis-Wirkungsbereichs, die eine DNA-Adduktanalytik auch in Geweben mit geringeren Adduktniveaus ermöglicht (HOLLNAGEL 2004). Die DNA ausgewählter Gewebe wurde isoliert und die DNA-Adduktniveaus wurden mittels ³²P-Postlabelling bestimmt. Als Standard diente jeweils 0,25 µg mit PhIP adduktierter Heringssperma-DNA (HOLLNAGEL 2004). Ausgewertet wurde nur der PhIP-C8-dG zuzuordnende Fleck (HOLLNAGEL 2004), der in den Chromatogrammen PhIP-behandelter DNA den Adduktfleck größter Intensität darstellte (Abbildung 31).

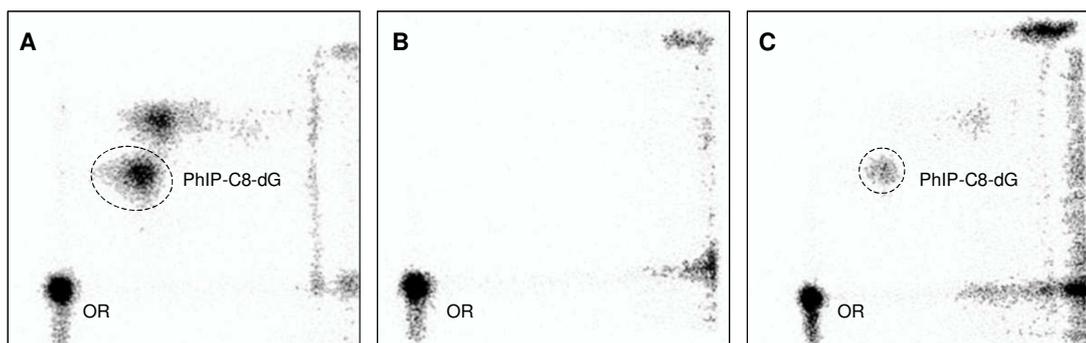


Abbildung 31: ^{32}P -Postlabelling-Chromatogramme A) 0,25 μg PhIP-DNA-Standard B) 2,5 μg Kolon-DNA einer mit dem Vehikel behandelten *hSULT1A1/1A2*-transgenen Maus C) 2,5 μg Kolon-DNA einer mit 90 mg/kg KG PhIP behandelten *hSULT1A1/1A2*-transgenen Maus. Durchbrochene Ellipsen markieren den zur Auswertung verwendeten, PhIP-C8-dG zuzuordnenden Fleck, OR den Auftragspunkt.

3.4.1.1 Vorversuche

Es wurden zwei Vorversuche durchgeführt. Im ersten Vorversuch sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, DNA-Addukte im Kolon von Mäusen nachzuweisen. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob ein Unterschied in den Adduktniveaus zwischen männlicher und weiblicher transgener Maus besteht. Außerdem sollte die im ^{32}P -Postlabelling-Experiment einzusetzende DNA-Menge bestimmt werden. Es wurden zwei transgene und zwei Wildtyp-Mäuse (jeweils männlich und weiblich) mit PhIP behandelt und nach 24 h zur Gewebeentnahme getötet. Zwei männliche transgene Tiere erhielten nur das Lösungsmittel (Vehikel-Kontrolle). Es wurden die DNA-Adduktniveaus in der Kolonmukosa beider transgener Tiere und eines männlichen Wildtyp-Tieres - alle mit PhIP behandelt - sowie eines Vehikel-Kontrolltieres untersucht (Abbildung 32A). Bei den mit PhIP behandelten Tieren waren DNA-Addukte nachweisbar (Abbildung 32A) und das Adduktniveau war bei den transgenen Mäusen deutlich höher als beim Wildtyp-Tier. Beim Vehikel-Kontrolltier wurden keine DNA-Addukte nachgewiesen. Der Unterschied im Adduktniveau zwischen der männlichen und der weiblichen mit PhIP behandelten transgenen Maus war gering (nicht dargestellt). Daher wurden in weiteren Versuchen ausschließlich männliche Tiere verwendet. Zur Einschätzung der im Hauptversuch für das ^{32}P -Postlabelling einzusetzenden DNA-Menge wurden jeweils 2,5 μg und 5 μg DNA auf PhIP-DNA-Addukte analysiert. Beim Einsatz von 2,5 μg DNA war sowohl das erfasste Adduktniveau bei den mit PhIP behandelten Tieren als auch der Unterschied im Adduktniveau zwischen transgenen Tieren und Wildtyp-Kontrolle höher als beim Einsatz von 5 μg DNA (Abbildung 32A). Um die opti-

male Menge der einzusetzenden DNA einzugrenzen, wurden im Folgenden unterschiedliche DNA-Mengen im ^{32}P -Postlabelling verwendet. Es zeigte sich, dass sowohl das Adduktniveau als auch die Differenz im Adduktniveau zwischen transgener und Wildtyp-Maus zwischen 2 und 3 μg DNA am besten erfassbar war (Abbildung 32B). Daher wurden in weiteren Experimenten immer 2,5 μg DNA eingesetzt.

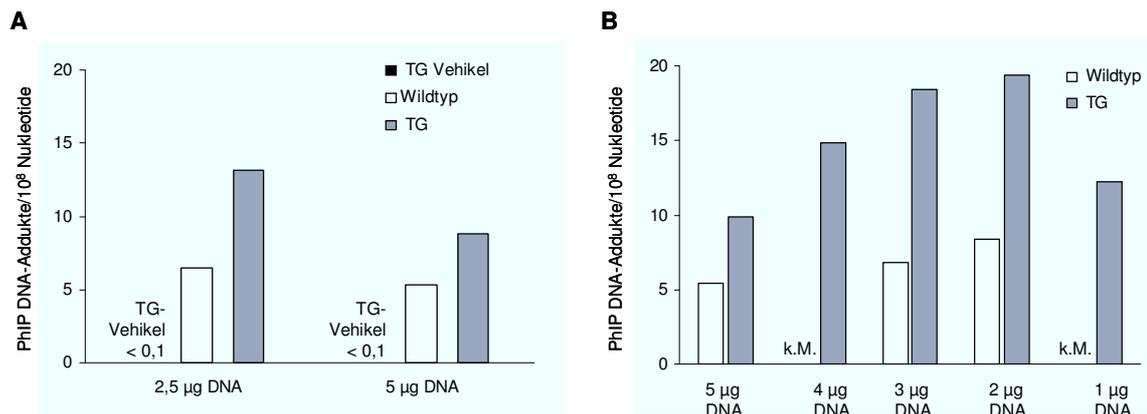


Abbildung 32: Vergleich der DNA-Adduktniveaus der Kolonmukosa zwischen *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen 24 h nach Behandlung mit 90 mg/kg KG PhIP und Vergleich mit Vehikel-Kontrollen mittels ^{32}P -Postlabelling. A) Einsatz von 2,5 und 5 μg DNA von transgenen Mäusen ($n = 2$; Mittelwert), einer Wildtyp-Maus ($n = 1$) und einer transgenen Vehikel-Kontrolle ($n = 1$). B) Einsatz unterschiedlicher Mengen DNA je einer männlichen transgenen und Wildtyp-Maus. TG: transgene Maus, Wildtyp: nicht-transgene FVB/N-Maus, k.M.: keine Messung beim Wildtyp für 1 und 4 μg DNA.

Im zweiten Vorversuch sollte der Zeitpunkt (4, 8 oder 24 Stunden) nach der PhIP-Applikation ermittelt werden, an dem die höchsten DNA-Adduktniveaus nachweisbar sind. Dazu wurde pro zu untersuchendem Zeitpunkt je einer männlichen transgenen und einer Wildtyp-Maus PhIP verabreicht und die DNA aus Kolonmukosa und Leber auf PhIP-DNA-Addukte analysiert (Abbildung 33). In der Kolon-DNA war das Adduktniveau nach 4 h deutlich niedriger als nach 8 h und schien bei der transgenen Maus nach 24 h wieder abzufallen. In der Leber-DNA wurde nahezu keine Veränderung in den DNA-Adduktniveaus zwischen den untersuchten Zeitpunkten festgestellt. Daher wurde für den Hauptversuch ein Zeitpunkt von acht Stunden nach PhIP-Applikation bis zur Tötung der Mäuse festgelegt.

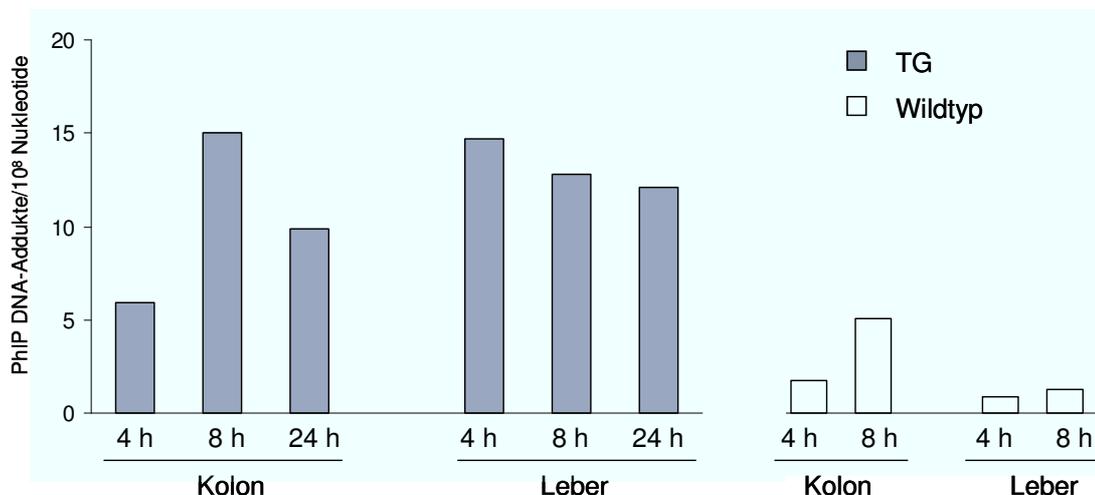


Abbildung 33: Vergleich der DNA-Adduktniveaus der Kolonmukosa und der Leber zwischen *hSULT1A1/1A2*-transgenen und Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit 90 mg/kg KG PhIP zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation. Es wurden 2,5 µg Kolonmukosa- und Leber-DNA je einer transgenen und einer Wildtyp-Maus eingesetzt und die Tötungszeitpunkte 4 h, 8 h und für die transgene Maus zusätzlich 24 h nach PhIP-Applikation untersucht.

3.4.1.2 Hauptversuch

Der Hauptversuch wurde entsprechend der in den Vorversuchen ermittelten Bedingungen durchgeführt. PhIP wurde je neun männlichen transgenen und Wildtyp-Mäusen oral verabreicht. Die Tiere wurden acht Stunden nach PhIP-Applikation getötet. Die PhIP-DNA-Adduktniveaus wurden in Leber, Niere, Lunge und Milz sowie der Mukosa von Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon untersucht.

Das DNA-Adduktniveau war jeweils in Leber, Lunge, Niere, Milz und Kolon der transgenen Mäuse gegenüber dem Adduktniveau in den entsprechenden Geweben der Wildtyp-Mäuse signifikant - in Leber, Lunge und Kolon hochsignifikant - erhöht (Abbildung 34). Die höchsten DNA-Adduktniveaus mit durchschnittlich etwa 100 Addukten pro 10⁸ Nukleotide wurden in den Lebern der transgenen Mäuse gemessen. Damit war das Adduktniveau gegenüber demjenigen in den Lebern der Wildtyp-Mäuse um das 17fache erhöht. In der Lunge der transgenen Mäuse lag das Adduktniveau bei 30 Addukten pro 10⁸ Nukleotide und war damit viermal höher als das Adduktniveau in der Lunge der Wildtyp-Mäuse.

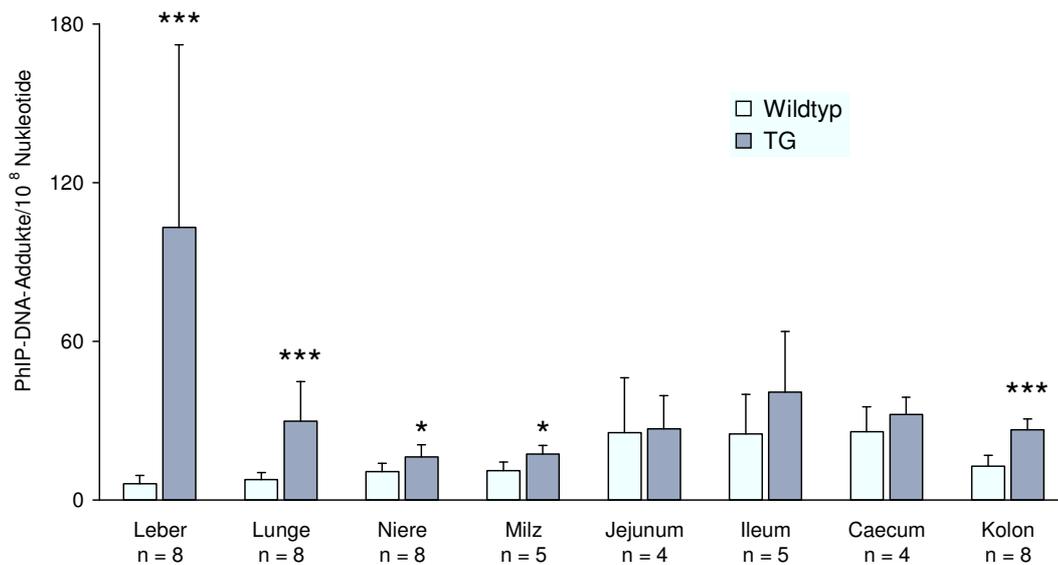


Abbildung 34: PhIP-DNA-Adduktniveaus in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts sowie in Leber, Lunge, Niere und Milz männlicher *hSULT1A1/1A2*-transgener und Wildtyp-Mäuse. Die Tiere wurden acht Stunden nach oraler Applikation von 90 mg/kg Körpergewicht PhIP getötet. Dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung. n bezeichnet die Anzahl der Tiere pro Gruppe. Sterne bezeichnen Gruppen transgener Tiere, die sich statistisch signifikant von der jeweiligen Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse unterscheiden (ein Stern: $p < 0,05$; drei Sterne: $p < 0,001$, Mann-Whitney Rangnummern-Test).

Ein mit 27 Addukten pro 10^8 Nucleotide doppelt so hohes Adduktniveau wie in den Wildtyp-Mäusen wurde im Kolon der transgenen Mäuse gemessen. Das insgesamt zweithöchste Adduktniveau mit 41 Addukten pro 10^8 Nucleotide lag im Ileum der transgenen Mäuse vor. Hier übertraf das mittlere Adduktniveau bei den transgenen Mäusen dasjenige bei Wildtyp-Mäusen um den Faktor 1,6. In Caecum und Jejunum waren die Adduktniveaus bei transgenen und Wildtyp-Mäusen mit 32 und 27 Addukten pro 10^8 Nucleotide (transgen) bzw. 26 und 25 Addukten pro 10^8 Nucleotide (Wildtyp) etwa gleich hoch. In Niere und Milz lagen bei den transgenen Tieren mit 16 bzw. 17 Addukten pro 10^8 Nucleotide höhere Adduktniveaus als bei den nicht-transgenen Tieren mit jeweils 11 Addukten pro 10^8 Nucleotide vor.

Beim Vergleich der Adduktniveaus in den unterschiedlichen Geweben innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Mäuse konnte festgestellt werden, dass die höchsten Werte im Intestinaltrakt erreicht wurden, wo sie für Jejunum, Ileum und Caecum etwa gleich hoch und im Kolon etwa halb so hoch wie in den weiter proximal gelegenen Abschnitten waren. In der Leber der Wildtyp-Mäuse wurde das insgesamt niedrigste Addukt-

niveau gemessen. Bei den transgenen Mäusen hingegen lag das mit deutlichem Abstand höchste Adduktniveau in der Leber vor. Das höchste Adduktniveau des Intestinaltrakts wurde bei den transgenen Mäusen im Ileum gemessen. Mit 32 bzw. jeweils 27 Addukten pro 10^8 Nukleotide folgten Caecum, Jejunum und Kolon. Das Gewebe, in dem das niedrigste Adduktniveau bei den transgenen Mäusen gemessen wurde, war die Niere.

3.4.2 1-HMP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen

1-Hydroxymethylpyren (1-HMP) ist ein Metabolit des hepatokanzerogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs 1-Methylpyren (MP) und ein Substrat für verschiedene Sulfotransferasen, darunter die humane SULT1A1, die es zu 1-Sulfoxymethylpyren (1-SMP) umsetzen (LANDSIEDEL 1998). 1-SMP ist ein starkes Elektrophil, welches bei Reaktion mit DNA genotoxisch wirken kann.

Es wurde untersucht, in welcher Weise die heterologe Expression der humanen Sulfotransferasen hSULT1A1 und hSULT1A2 in den transgenen Mäusen der Linie 7 die Entstehung von DNA-Addukten nach Verabreichung von 1-HMP in verschiedenen Geweben beeinflusst. Dazu wurden jeweils vier weiblichen transgenen und Wildtyp-Mäusen einmalig 19 mg ($83,3 \mu\text{mol}$) pro kg KG 1-HMP als 50 mM Lösung in DMSO mittels intraperitonealer Injektion verabreicht. Ein weiteres transgenes Tier erhielt eine entsprechende Applikation des Lösungsmittels als Vehikel-Kontrolle. Je zwei transgene und Wildtyp-Mäuse wurden nach 0,5 h, die übrigen Tiere nach 3 h zur Organentnahme getötet. Dosis, Tötungszeitpunkt und Applikationsart wurden entsprechend den Bedingungen aus Tierversuchen gewählt, in denen 1-HMP Ratten verabreicht worden war (MA 2001; DONATH 2008). Anschließend wurde die DNA verschiedener Gewebe isoliert und mittels ^{32}P -Postlabelling hinsichtlich des Vorkommens von DNA-Addukten analysiert. Als Standard diente mit 1-SMP inkubierte Heringssperma-DNA. Beim Verwenden dieses Standards im ^{32}P -Postlabelling konnten sechs Adduktflecken unterschiedlicher Intensität detektiert werden (Abbildung 35B). In der DNA aus Leber, Niere und Lunge des transgenen Tieres, dem als Kontrolle nur das Lösungsmittel verabreicht worden war, ließen sich keine DNA-Addukte nachweisen (Abbildung 35A). Bei den transgenen und Wildtyp-Tieren, die mit 1-HMP behandelt worden waren, konnten DNA-Addukte nachgewiesen werden, die sich als Adduktflecken gleichen Musters, aber deutlich schwächerer Intensität als beim Standard darstellten (Abbildung 35C und D).

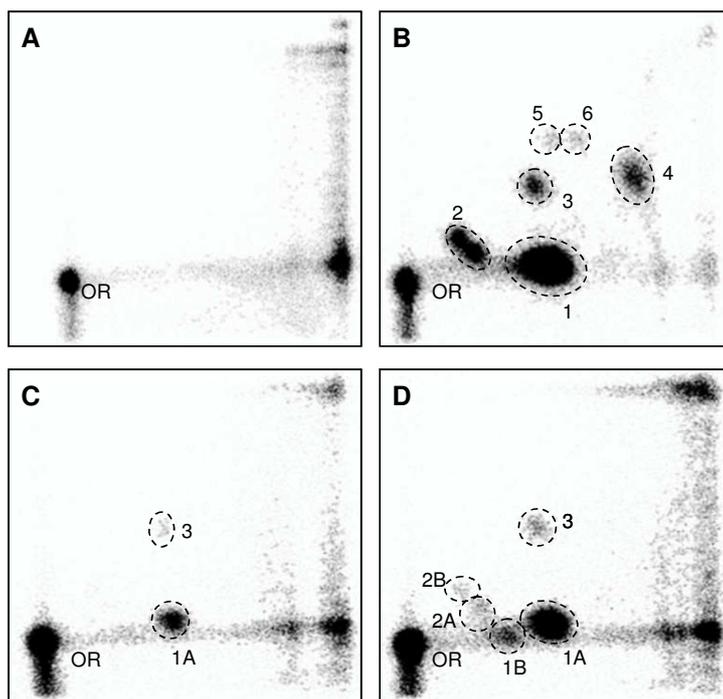


Abbildung 35: ^{32}P -Postlabelling-Chromatogramme. **A)** 5 μg Leber-DNA einer mit dem Vehikel (DMSO) behandelten weiblichen *hSULT1A1/1A2*-transgenen Maus 3 h nach intraperitonealer Applikation. **B)** 2,5 μg 1-SMP-addukturierte DNA als Addukt-Standard. **C)** 5 μg Leber-DNA einer mit 19 mg/kg KG 1-HMP behandelten weiblichen Wildtyp-Maus 0,5 h nach intraperitonealer Applikation. **D)** 5 μg Leber-DNA einer mit 19 mg/kg KG 1-HMP behandelten weiblichen *hSULT1A1/1A2*-transgenen Maus 0,5 h nach intraperitonealer Applikation. Durchbrochene Ellipsen markieren die zur Auswertung verwendeten Flecken, die 1-SMP zuzuordnen waren, OR markiert den Auftragspunkt, 1, 1A und 1B (usw.): Adduktflecken gleicher Position in den verschiedenen Chromatogrammen.

In allen untersuchten Geweben der transgenen Mäuse konnten DNA-Addukte detektiert werden. Die höchsten Adduktniveaus wurden in Leber, Niere, Caecum und Lunge mit 609, 417, 206 bzw. 180 Addukten pro 10^8 Nukleotide 0,5 h nach 1-HMP-Gabe detektiert (Tabelle 5). Es folgten Jejunum, Milz und Duodenum mit 117, 101 bzw. 80 Addukten pro 10^8 Nukleotide. In Uterus, Thymus, Ileum, Pankreas und Kolon lagen die Adduktwerte unter 20 Addukten pro 10^8 Nukleotide (Tabelle 5). Bei den Wildtyp-Mäusen waren das Adduktniveau in Caecum, Leber, Duodenum, Niere und Lunge mit 195, 174, 112, 78 bzw. 67 Addukten pro 10^8 Nukleotide 0,5 h nach 1-HMP-Gabe am höchsten (Tabelle 5). Damit war es in der Leber 3,5mal, in der Niere 5mal und in der Lunge 3mal niedriger als bei den transgenen Mäusen. Das Adduktniveau im Caecum hingegen war bei Wildtypen und Transgenen etwa gleich hoch. Im Duodenum, dem

Gewebe, in dem die heterologe SULT1A1/1A2-Expression bei den Mäusen der Linie 7 nicht nachgewiesen werden konnte, lag das Adduktniveau bei den Wildtypen etwas höher als bei den Transgenen. In Jejunum und Milz der Wildtyp-Mäuse wurden Adduktwerte von 5 bzw. 30 Addukten pro 10^8 Nukleotide ermittelt. Damit war das Adduktniveau bei den Wildtyp-Mäusen im Jejunum 25mal und in der Milz 3mal niedriger als bei den transgenen Mäusen.

Im Gastrointestinaltrakt wurden sowohl bei den Transgenen als auch bei den Wildtypen die höchsten Adduktwerte im Caecum gemessen. Trotz der hohen hSULT1A1/1A2-Expression im Caecum der Transgenen war das Adduktniveau bei Transgenen und Wildtypen hier etwa gleich hoch. Im Jejunum hingegen lag bei den Wildtypen das niedrigste, bei den Transgenen jedoch das zweithöchste Adduktniveau des Gastrointestinaltrakts vor. Im daran anschließenden Ileum waren bei den Transgenen nur wenige und bei den Wildtypen keine Addukte nachweisbar.

Drei Stunden nach 1-HMP-Gabe waren bei den transgenen Mäusen die Adduktwerte in Leber, Niere, Caecum und Lunge auf 90, 21, 97 bzw. 66 und in Jejunum und Milz auf 25 bzw. 46 Addukte pro 10^8 Nukleotide zurückgegangen (Tabelle 5). Damit lag das Adduktniveau im Caecum und in der Milz 2mal, in der Lunge 3mal, im Jejunum 5mal, in der Leber 7mal und in der Niere 20mal niedriger als nach 0,5 h.

Bei den Wildtyp-Mäusen waren nach 3 h, wie bereits nach 0,5 h in Ileum und Pankreas, auch in Thymus und Jejunum keine Addukte mehr nachweisbar (Tabelle 5). In Caecum, Leber, Lunge, Milz und Niere waren die Adduktwerte auf 77, 26, 14, 8 bzw. 6 Addukte pro 10^8 Nukleotide gesunken. Somit lag auch bei den Wildtyp-Mäusen im Caecum die verhältnismäßig geringste Abnahme im Adduktniveau vor (3mal niedriger), während das Adduktniveau in der Milz 4mal, in der Lunge 5mal, in der Leber 7mal und in der Niere 12mal niedriger war als nach 0,5 h.

4 Diskussion

4.1 Konstruktion der transgenen Mauslinien

Viele transgene Tiermodelle werden generiert, um die Wirkung der Expression eines Transgens in einem spezifischen Organ oder Gewebe auf den transgenen Organismus untersuchen zu können. Die zu ihrer Erstellung verwendete Methode besteht meist darin, ein Gen-Konstrukt herzustellen, das sich aus einem Promotor mit bekannter Gewebespezifität und dem kodierenden Bereich der cDNA des zu untersuchenden Gens zusammensetzt. Diese Konstrukte sind aufgrund ihrer geringen Größe molekularbiologisch relativ einfach isolierbar, manipulierbar und nachweisbar. Für verschiedene Organe oder Gewebe stehen gut beschriebene Promotoren zur Verfügung, die eine spezifische Expression bewirken können. Ein Beispiel für ein solches Mausmodell sind die von LEFF *et al.* (1999) erzeugten, für die humane NAT2 transgenen Mäuse. Zur Erstellung dieser Mäuse wurde die humane NAT2 mit den regulatorischen Elementen des Ratten-Probasin-Gens kombiniert. Das Probasin-Gen wird spezifisch in Prostata-Epithelzellen exprimiert (KASPER *et al.* 1994). LEFF *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die spezifische NAT2-Aktivität im Prostatagewebe, nicht jedoch in anderen Geweben, gegenüber einer Kontrolle stark erhöht war. Sie nutzten das Mausmodell, um die NAT2-vermittelte Bioaktivierung von PhIP in der Prostata zu untersuchen.

Die Mausmodelle für die *hSULT1A1/1A2* bzw. *hSULT1B1* sollten hingegen nicht nur die Wirkung der Expression der humanen Enzyme in einem ausgewählten Organ oder Gewebe abbilden. Sie sollten erzeugt werden, um den Einfluss der gewebespezifischen Expression dieser Enzyme auf Organotropismen der DNA-schädigenden Wirkung von Metaboliten untersuchen zu können. Dazu ist es notwendig, über ein Tiermodell zu verfügen, in dem die Gewebeverteilung der hSULT-Expression der im Menschen entspricht. Da sich die Expression der humanen *SULT*-Gene nicht auf ein Gewebe beschränkt, sondern die *hSULT1A1* nahezu ubiquitär und die *hSULT1B1* in der Leber sowie im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden, musste zur Erzeugung der transgenen Linien ein anderer als der oben geschilderte Ansatz gewählt werden. Damit

sich die Expressionsmuster bei Mensch und transgener Maus möglichst exakt entsprechen, war es notwendig, auch die Expressionsregulation dem Menschen entsprechend erfolgen zu lassen. Zum Zeitpunkt der Erstellung der transgenen Mauslinien waren keine Promotoren alternativer Gene beschrieben, die zur Lenkung einer solchen Expression hätten verwendet werden können. Auch war wenig über die Transkriptionsregulation der *SULT*-Gene bekannt.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der vier humanen *SULT1A*-Gene, die durch Genduplikationen auseinander hervorgegangen sind, gab es – insbesondere vor der Veröffentlichung der humanen Genomsequenzen – widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Zahl der Gene sowie ihrer Lage zueinander. In den zu Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Sequenzen des Humangenomprojekts waren *hSULT1A1* und *-1A2* nahe *hSULT1A3* und auf dem gleichen Strang wie dieses Gen angeordnet worden (DOOLEY *et al.* 1993; AKSOY *et al.* 1994; DOOLEY *et al.* 1994; DOOLEY und HUANG 1996; HER *et al.* 1996). Es wurde von einer Distanz von 45 kb zwischen *hSULT1A1* und *-1A2* ausgegangen (RAFTOGIANIS *et al.* 1996) und das *hSULT1A4*-Gen als Duplikation des *hSULT1A3*-Gens (HILDEBRANDT *et al.* 2004) war noch nicht beschrieben worden. Mittlerweile wurde gezeigt, dass die *hSULT1A3* und die inzwischen nachgewiesene *hSULT1A4* auf dem Gegenstrang zu *hSULT1A1/1A2* mit einer Distanz von etwa 1 Mb zwischen den beiden Gen-Orten (BRADLEY und BENNER 2005) liegen, während der Abstand zwischen den Genen der *hSULT1A1* und *-1A2* nur 8,6 kb beträgt (humanes Genomprojekt).

Für die humanen *SULTA1*- und *SULT1A2*-mRNA-Spezies waren zwei alternativ transkribierte, nichtkodierende erste Exons identifiziert und eine Promotor-Aktivität für die Abschnitte 5' dieser Exons nachgewiesen worden (ZHU *et al.* 1993a; ZHU *et al.* 1993b; BERNIER *et al.* 1994; BERNIER *et al.* 1996; RAFTOGIANIS *et al.* 1996). Diese Promotor-Aktivität ist mittlerweile umfangreich untersucht und es sind relevante Sequenzmotive für die Promotor-Wirkung identifiziert worden (HEMPEL *et al.* 2004; HEMPEL *et al.* 2005). So wurde nachgewiesen, dass die stärkste Transkriptionsaktivierung von dem distal gelegenen Promotor ausgeht und dass die synergistische Wirkung der ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren Sp1 und GA-bindendes Protein eine hohe Aktivität dieses Promotors vermittelt. Jedoch ist immer noch unbekannt, durch welche Faktoren die zellspezifische Expression bzw. Expressionsstärke reguliert wird.

Welche Faktoren die zellspezifische Expression und die Expressionsstärke der humanen *SULT1B1* regulieren, ist ebenfalls noch nicht bekannt. Bei der Untersuchung der 5'-untranslatierten Abschnitte der *SULT1B1*-cDNAs aus unterschiedlichen Geweben wurden keine Sequenzunterschiede gefunden, so dass vermutlich andere Mechanismen als alternatives Splicing oder alternative Transkriptionsstartpunkte für die ausgeprägten Unterschiede in der gewebespezifischen Expressionsintensität verantwortlich sind (MEINL und GLATT 2001). Sowohl für die *hSULT1A1/1A2*-Gene als auch für das *hSULT1B1*-Gen könnten transgene Mauslinien, bei denen die Expression der Gene in gleicher Weise wie beim Menschen erfolgt, dazu dienen, mehr über die Regulation ihrer Transkription herauszufinden.

Zur Erzeugung solcher Mauslinien wurden die humanen Gene in ihrer eigenen genomischen Umgebung in das Mausgenom integriert. Damit sollten die erforderlichen *cis*-agierenden regulatorischen DNA-Sequenzen gemeinsam mit dem zu exprimierenden Gen in die Maus überführt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Ansatzes ist, dass ein potentieller Einfluss der genomischen Umgebung am Integrationsort auf die Expression der Transgene reduziert wird. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die erforderlichen Transkriptionsfaktoren bei der Maus nicht vorhanden sind oder nicht in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. Es kann sein, dass die humanen *cis*-agierenden Sequenzen so von den entsprechenden murinen abweichen, dass orthologe murine Transkriptionsfaktoren die humanen Sequenzen nicht erkennen. Auch ist möglich, dass *cis*-Elemente der humanen Gene, die außerhalb des Konstrukts liegen, an der Genregulation beteiligt sein könnten.

In der Literatur sind transgene Modelle beschrieben, bei denen der geschilderte Ansatz zu einer humanen Gewebeverteilung der Transgene in der entsprechenden Mauslinie führte. Beispiele dafür sind die transgenen Mauslinien für die humanen Gene *Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6)* (CORCHERO *et al.* 2001), *CYP1A1* und *-1A2* (CHEUNG *et al.* 2005a) sowie *CYP2E1* (CHEUNG *et al.* 2005b), die mit humane Gensequenzen enthaltenden Lambda-Phagen-Klonen bzw. BAC-Klonen erstellt wurden. Dagegen wurde im *hCYP3A4*-Mausmodell das Transgen zwar dem Menschen entsprechend im Dünndarm, nicht jedoch in der Leber der transgenen Mäuse exprimiert, was die Autoren auf ein mögliches Fehlen *cis*-agierender Bindungsstellen für die notwendigen Transkriptionsfaktoren im BAC-Transgen-Konstrukt oder auf einen Einfluss des Integrationslocus auf die Transkriptionsregulation zurückführten (GRANVIL *et al.* 2003).

Die für die Erstellung der *hSULT1A1/1A2*- und *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien zur Verfügung stehenden, die erforderlichen Humansequenzen enthaltenden PAC-Klone wurden vor ihrem Einsatz zur Transfektion der befruchteten Oozyten hinsichtlich der Länge der Stromaufwärtsbereiche der humanen Gene untersucht. Diese sollten möglichst lang sein, um alle transkriptionsregulatorisch wirkenden Abschnitte mit in die Mäuse zu überführen. Allerdings sollte auch vermieden werden, zusätzlich zu den Sulfotransferase-Genen weitere humane kodierende Sequenzen in die Mäuse zu überführen, um sichergehen zu können, dass beobachtete Unterschiede zwischen transgenem Modell und Wildtyp auf die Expression der SULT zurückzuführen sind.

Aus dem nach diesen Kriterien zur Erstellung der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse am besten geeigneten PAC Nr.1 (RPCI-Klon 704J18921Q2), der etwa 36 kb Stromaufwärtssequenz vor der *hSULT1A1* aufwies, wurden etwa 50 kb im Bereich stromabwärts der *hSULT1A2* eliminiert und damit zwei zusätzliche kodierende Abschnitte zerstört. Der PAC-Klon (RPCI-Klon 704789L15), der zur Erzeugung der *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien zur Verfügung stand, wies vor dem humanen Gen mit nahezu 70 kb einen langen Stromaufwärtsbereich auf, der das 22 kb große Pseudogen *hSULT1D1P* enthielt, und konnte unverändert zur Transfektion der Oozyten eingesetzt werden.

Die PAC-Konstrukte wurden vor der Injektion in die Oozyten durch Restriktionsverdau linearisiert. Wegen der durch die Größe dieser PAC-Konstrukte bedingten Empfindlichkeit wurden die weiteren Arbeitsschritte soweit optimiert, dass möglichst wenige Manipulationsschritte durchgeführt werden mussten. Nach der Identifizierung der transgenen Foundertiere erfolgte die Überprüfung der Integrität der Transgene sowohl für die Tiere der F0- als auch für die Tiere der F1-Generation. Da sich alle untersuchten Sequenzabschnitte in beiden Generationen nachweisen ließen, wurde von einer korrekten Integration des humanen DNA-Abschnitts in das Mausgenom ausgegangen.

4.2 Charakterisierung und Zucht der transgenen Linien

4.2.1 Bestimmung der chromosomalen Integration der Transgen-Konstrukte

Zur Durchführung von Tierexperimenten mit aussagekräftigen Resultaten ist der Einsatz genetisch möglichst uniformer Tiere erforderlich. Der zur Erzeugung der transgenen Mauslinien verwendete Inzuchtstamm FVB/N liefert einen uniformen gene-

tischen Hintergrund. Für das nach dem Zufallsprinzip ins Mausgenom integrierte Transgen muss ebenfalls ein Zustand der genetischen Uniformität erzeugt werden. Dafür ist es notwendig, die Zahl der chromosomalen Integrationsorte des Transgens zu bestimmen. Sind Integrationen in verschiedene Mausechromosomen aufgetreten, so müssen diese durch Zucht von einander separiert werden. Mittels Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FISH) konnten die chromosomalen Integrationsorte der Transgene sowohl für die *hSULT1A1/1A2*- als auch für die *hSULT1B1*-transgenen Mauslinien bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass bei allen in dieser Arbeit erzeugten Linien - bis auf die *hSULT1A1/1A2*-transgene Linie 714 - nur ein einziger chromosomaler Integrationsort vorlag. Bei Linie 714 war eine Integration des Transgenabschnittes in zwei unterschiedliche Chromosomen erfolgt. Durch entsprechende Zucht konnten die beiden Integrationsorte getrennt und genetisch uniforme Sublinien erzeugt werden.

Ein weiteres Ergebnis der FISH-Analysen war die Kenntnis der genauen chromosomalen Zuordnung der Transgen-Integration. Diese ist für die Projekte notwendig, die zukünftig mit den Mauslinien durchgeführt werden sollen. So war die Generierung von knock-out-(k.o.)-Modellen für die mauseigenen Sulfotransferasen *mSult1a1* und *mSult1d1* ein Kooperationsprojekt der hier dargestellten Arbeit. Nach Rückkreuzung der k.o.-Linien gegen den FVB/N-Hintergrund sollen durch ihr Verkreuzen mit den transgenen Linien sogenannte „humanisierte“ Linien gezüchtet werden, die die humanen Enzyme, nicht aber das mauseigene Enzym exprimieren. Falls die Integration des Transgens in demselben Chromosom stattgefunden hätte, in dem der Gen-Ort der mauseigenen ausgeschalteten Sulfotransferase liegt, könnten beide genetischen Eigenschaften nicht durch einfache Verkreuzung miteinander kombiniert werden. Zwar wäre, wenn das Transgen weit genug vom knock-out des homologen Chromosoms entfernt läge, eine Kombination der genetischen Eigenschaften möglich gewesen. Dazu hätte es zur homologen Rekombination zwischen den beiden Chromosomen kommen müssen, deren sicherer Nachweis mit erheblichem Aufwand verbunden wäre. Es fand jedoch in keiner der transgenen Linien eine Integration der humanen DNA in die Chromosomen 5 oder 7, welche die mauseigenen Sulfotransferasen *Sult1b1* und *Sult1d1* bzw. *Sult1a1* kodieren, statt, so dass mit jeder der Linien unkompliziert humanisierte Modelle erzeugt werden können.

4.2.2 Zucht zur Homozygotie

Bis auf die *hSULT1A1/1A2*-transgene Linie 633 wurden alle Mauslinien durch Züchtung in den homozygoten Zustand überführt. Der Vorteil homozygoter Linien

besteht darin, dass bei der Zucht von Tieren für einen Tierversuch ausgehend von einem für das Transgen homozygoten Männchen zeitnah zahlreiche identische hemizygote Nachkommen erzeugt werden können. Außerdem stellen Lebensfähigkeit und unauffälliger Phänotyp der homozygot transgenen Tiere einen Hinweis darauf dar, dass sich das Transgen nicht in lebensnotwendige Gensequenzen inseriert hat, wovon bei Linie 633 ausgegangen werden muss. Des Weiteren entfällt bei der Erhaltungszucht homozygoter Linien die Notwendigkeit einer Genotypisierung hinsichtlich des Transgens, was bei der Zucht mehrerer Linien eine erhebliche Zeitersparnis bedeutet.

4.2.3 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens

Die Methode der semi-quantitativen Echtzeit-PCR, die zur Bestimmung des Zygote-Status der Mäuse verwendet wurde, konnte auch genutzt werden, um eine Aussage über die Zahl der pro Mauslinie integrierten Transgen-Kopien zu treffen. Die Werte, die für das Verhältnis zwischen dem Transgen und dem β -Globin-Gen als internem Standard ermittelt wurden, waren zwar innerhalb eines Experimentes, jedoch nicht von Experiment zu Experiment konstant. Daher konnten mit der Methode zwar die Transgen-Quantitäten der unterschiedlichen Linien zu einander ins Verhältnis gesetzt, jedoch keine Absolutwerte für die Transgen-Kopienzahl der einzelnen Linien abgeleitet werden.

Die transgene Linie mit der niedrigsten Kopienzahl war die *hSULT1B1*-transgene Linie 275. Aufgrund der Resultate des Genome Walking konnte für diese Linie vom Vorliegen nur einer einzelnen Transgen-Kopie ausgegangen und die Kopienzahl für die anderen Linien im Verhältnis zu Linie 275 errechnet werden. Bei den Linien mit niedrigen Kopienzahlen war die Schwankung zwischen den ermittelten Verhältnissen gering, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit von zwei Transgen-Kopien pro haploidem Genom für Linie 12 und Linie 633 und drei Transgen-Kopien für Linie 5 ausgegangen werden kann. Die ermittelten Verhältnisse der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 zu den Linien mit niedrigerer Kopienzahl waren stärkeren Schwankungen unterworfen, so dass für diese Linie von etwa zwanzig integrierten Transgen-Kopien pro haploidem Genom ausgegangen werden kann.

Die multiple Integration von PAC- bzw. BAC-Konstrukten an einer einzelnen Integrationsstelle wurde auch von anderen Autoren beschrieben. So wiesen VADOLAS *et al.* (2005) die Integration von bis zu sechs Kopien eines das humane β -Globin-Gen tragenden BAC-Konstrukts an einem Integrationsort in ihren transgenen Mauslinien

nach und XING *et al.* (2007) bestimmten ebenfalls in einem Integrationsort eine Zahl von fünfzehn Kopien ihres das humane COL6A1-Gen tragenden BAC-Konstrukts.

Transgene Linien, bei denen dasselbe Konstrukt in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegt, ermöglichen bei der Durchführung von Tierversuchen eine den Versuchserfordernissen entsprechende Linienauswahl, wenn, wie in dieser Arbeit beschrieben, eine Korrelation zwischen Transgen-Kopienzahl und Expressionsstärke des Transgens vorliegt (Abschnitt 3.3.1). Die etwa zwanzig Kopien der *hSULT1A1*- und *-1A2* tragende Linie 7 wurde aufgrund ihrer starken Überexpression der humanen Gene für erste Tierversuche ausgewählt. Mit ihr konnte die Bedeutung der *hSULT1A1/1A2* für die Bioaktivierung von PhIP und 1-HMP klar gezeigt werden (Abschnitt 3.4). Um die Situation im Menschen genauer modellieren zu können, besteht die Möglichkeit, in zukünftigen Versuchen Linien mit niedrigerer Kopienzahl und niedrigerer Transgen-Expression, wie beispielsweise die Sublinien der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 714 einzusetzen. HEBBRING *et al.* (2007) haben für den Menschen Unterschiede in der Kopienzahl des *SULT1A1*-Gens mit einer Variationsbreite von einem bis zu fünf Allelen beschrieben. Demnach tragen 26% der untersuchten Kaukasier (drei Studien mit $n = 95$, $n = 267$ und $n = 362$) und 63% der untersuchten Afroamerikaner (eine Studie mit $n = 99$) mehr als zwei Allele des *SULT1A1*-Gens und es wurde eine Korrelation der Kopienzahl mit der Enzymaktivität der *SULT1A1* gezeigt. Da die in dieser Arbeit erzeugten Mauslinien unterschiedliche *hSULT1A1/1A2*-Kopienzahlen tragen, können sie auch als Modell für die humanen Kopienzahl- und Aktivitätsunterschiede dienen.

4.2.4 Untersuchung des Genlocus der Transgen-Integration

Bei der Herstellung einer transgenen Mauslinie ist die Zielsetzung, einen Phänotyp zu erzeugen, der auf die Expression des Transgens zurückzuführen ist. Da die Integration des Transgen-Konstrukts bei der gewählten Methode der Mikroinjektion zufällig erfolgt, kann der genaue Integrationsort des Konstrukts nicht vorhergesagt werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass der beobachtete Phänotyp der transgenen Linie auch durch den Integrationsort des Transgens beeinflusst wird; das Transgen übt einen sogenannten „Positionseffekt“ aus. So könnte beispielsweise die Integration des Transgen-Konstrukts in ein mauseigenes Gen zu einem unerwünschten „Knock-Out“ dieses Gens führen. Ein solches Ereignis könnte erklären, warum die *hSULT1A1/1A2*-transgene Mauslinie 633 sich nicht durch Zucht in den homozygoten Zustand überführen ließ (Abschnitt 4.2.2).

Um feststellen zu können, ob ein Positionseffekt der Transgen-Integration vorliegt, muss die den Integrationsort flankierende Sequenz des Mausgenoms ermittelt werden. Durch Abgleich dieser Sequenz mit der genomischen Datenbank der Maus ist es möglich, den genauen Integrationsort zu bestimmen und ihn auf mögliche kodierende Sequenzen zu untersuchen.

Zur Ermittlung der Sequenz eines Integrationsort-flankierenden DNA-Abschnitts stehen verschiedene, PCR-basierte Techniken zur Verfügung. Das Prinzip dieser Techniken beruht darauf, eine PCR durchzuführen, deren Produkt den Übergang zwischen bekannter und unbekannter Sequenz darstellt. Hui *et al.* (1998) geben unter dem Aspekt der Integrationsortsbestimmung von Virus- bzw. Transposon-DNA ins Wirtsgenom eine Übersicht über verschiedene solcher Techniken, wie beispielsweise der inversen PCR, der *Alu*-Element-vermittelten PCR und der Vectorette- oder Splinkerette-PCR. Die in dieser Arbeit verwendete Technik des Genome Walking unter Verwendung des „Universal GenomeWalker“-Kits der Firma Clontech beruht auf demselben Prinzip wie die beiden letztgenannten Methoden. Für jede dieser Techniken besteht die Notwendigkeit, einen der unbekannteren Sequenz benachbarten Sequenzabschnitt zu kennen, um eine der Primer-Richtungen an ihm orientieren zu können.

Zur Herstellung der transgenen *SULT*-Mauslinien waren die verwendeten ringförmigen PAC-Konstrukte vor der Mikroinjektion mittels *SalI*-Verdau linearisiert worden. Es wurde angenommen, dass die Integration ins Mausgenom im Bereich der durch die Restriktion erzeugten DNA-Enden stattfinden würde. Jedoch enthielt keines der PCR-Produkte, die mit an diesen Sequenzabschnitten definierten Primern erzeugt worden waren, Sequenzbereiche aus dem Genom der Maus. Einige der erzeugten PCR-Produkte enthielten hingegen den Bereich stromauf- und stromabwärts der *SalI*-Schnittstelle. Solche PCR-Produkte könnten auftreten, falls sich das Konstrukt nicht an der oben genannten Schnittstelle geöffnet hätte. Allerdings war die Vollständigkeit des *SalI*-Verdaus vor der Mikroinjektion durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft worden. Es ist offenbar möglich, dass im Verlauf des Integrationsprozesses eine Re-zirkularisierung an der Restriktionsschnittstelle bei gleichzeitiger Öffnung an einer anderen Stelle im Konstrukt oder eine Konkaterbildung mehrerer Konstrukt-moleküle stattgefunden hat. Die Komplexität der Vorgänge, die bei der Integration von Fremd-DNA in ein Chromosom auftreten können, zeigte sich in weiteren PCR-Produkten, bei denen der Sequenzabschnitt um die *SalI*-Schnittstelle von der Sequenz des Ausgangsmoleküls abwich. Beispielsweise war der bei der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 633 nachgewiesene Abschnitt um etwa 200 bp kürzer und es fehlte die *SalI*-

Schnittstelle. Da in keinem der untersuchten PCR-Produkte murine Gensequenzen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die äußersten Sequenzbereiche derjenigen Konstruktomoleküle, die den Übergang in die murine chromosomale DNA bilden, beim Integrationsprozess eliminiert worden sind.

Aufgrund der Größe der Konstrukte wäre es mit erheblichem Aufwand verbunden, sich mittels PCR schrittweise dem Übergangsbereich zwischen Transgen und Mausgenom anzunähern. Falls zusätzlich Phänomene wie Teilkonkatemerbildungen, Inversionen oder Translokationen muriner und/oder aus den Konstrukten stammender humaner DNA-Bereiche aufgetreten sind, wäre es jedoch äußerst fraglich, ob mit diesen Methoden die Integrationsorte erfolgreich bestimmt werden können. Verschiedene Autoren beschreiben den Nachweis der flankierenden Sequenzen von Transgen-Konstrukten ihrer transgenen Linien mittels PCR-basierter Techniken (MACGREGOR und OVERBEEK 1991; NOGUCHI *et al.* 2004; ZHAI *et al.* 2004; SUZUKI *et al.* 2006). Selbst bei deutlich kürzeren Transgen-Konstrukten (3,5 bis 4,5 kb) bestanden Schwierigkeiten, den genauen Integrationsort zu bestimmen (NOGUCHI *et al.* 2004; SUZUKI *et al.* 2006). SUZUKI *et al.* (2006) diskutieren die molekularen Mechanismen, die bei der Erstellung einer transgenen Linie auftreten können. Sie nennen extrachromosomale Verknüpfungen der Konstrukte, Deletionen, Duplikationen, Translokationen chromosomaler DNA an der Integrationsstelle sowie die Insertion von Sequenzen unbekanntem Ursprungs. Auch ZHAI *et al.* (2004) konnten bei 18 von 34 transgenen Reis-Linien nicht die flankierenden Bereiche ermitteln, da sich bei der Integration Deletionen und Verknüpfungen der Konstrukte ereignet hatten. Insbesondere bei großen Transgen-Konstrukten, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, können diese Mechanismen die Ermittlung der flankierenden Sequenzen des Konstrukts erschweren oder verhindern.

Hinsichtlich Verhalten, Fortpflanzung und Lebensdauer wurden zwischen den homozygoten Tieren der drei *hSULT1B1*-transgenen Linien sowie der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 und den Tieren des Wildtyps im Verlauf von drei Jahren der Zucht keine offensichtlichen Unterschiede festgestellt. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass bei diesen Linien keine lebensnotwendigen Gene durch die Transgen-Integration zerstört wurden. Die Möglichkeit eines Positionseffekts bei der transgenen Linie 633 wurde bereits oben angesprochen. Ob einer der beiden bei Linie 714 vorliegenden Integrationsorte des Transgens im homozygoten Zustand die Lebensfähigkeit der Tiere beeinträchtigt, wird untersucht werden können, wenn beide Orte durch Zucht separiert in homozygoten Sublinien vorliegen.

4.3 Proteinbiochemische Charakterisierung

4.3.1 Immunblot-Analyse der hSULT-Expression in den transgenen Mauslinien

Mit der Überprüfung der Expression der humanen Proteine im Mausmodell wurde in der F1-Generation der jeweiligen Linie begonnen. Es war von Interesse, die Gewebe zu identifizieren, in denen die Proteine exprimiert werden, zu einer Einschätzung der Quantität der Expression zu gelangen und diese, wo möglich, mit den entsprechenden humanen Proben zu vergleichen.

Für die *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien wurde eine Expression der humanen Proteine in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Die umfangreichste Charakterisierung der Expression wurde für die Linie 7 durchgeführt, da diese Linie aufgrund der ausgeprägten Überexpression der humanen Proteine und der unkomplizierten Zucht (nur ein Integrationsort des Transgens) als am geeignetsten zur Durchführung der toxikologischen Studien eingestuft wurde. Bei ihr erfolgte eine starke Expression der humanen Proteine im Intestinaltrakt in allen Abschnitten caudal des Duodenums sowie in Leber, Lunge, Niere und verschiedenen weiteren Geweben.

Somit wird die humane SULT1A1 in dieser Mauslinie wie beim Menschen mit einer breiten Gewebeverteilung exprimiert. Beim Menschen wurde eine Expression der hSULT1A1 im gesamten Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (WINDMILL *et al.* 1998), während bei den transgenen Mäusen der Linien 7 und 633 in Magen und Duodenum keine Expression nachzuweisen war, die Linie 714 jedoch eine deutliche Expression im Duodenum und eine schwache Expression im Magen zeigte. Folglich scheint das Fehlen einer Expression im Duodenum der Linien 7 und 633 kein mausspezifisches Phänomen darzustellen. Nach erfolgtem Auseinanderzüchten der beiden bei Linie 714 vorliegenden Integrationsorte des Transgens kann untersucht werden, ob die Vermittlung der Expression im Duodenum von beiden oder nur von einem der beiden Integrationsorte ausgeht.

In einer dieser Dissertation angegliederten Diplomarbeit (SCHADE 2008) wurde die hSULT1A1- und hSULT1A2-Proteinexpression in Leber, Niere, Lunge, Jejunum und Kolon der transgenen Linie 7 quantifiziert und zur Expression beim Menschen ins Verhältnis gesetzt. Der Anteil der hSULT1A1 an der Gesamtmenge des zytosolischen Proteins lag bei 4,3% für die Leber, 1,2% für die Niere, 0,5% für die Lunge, 1,9% für das Jejunum und 0,9% für das Kolon. Beim Menschen hingegen liegt der Anteil an SULT1A1 in der Leber zwischen 0,07 und 0,3% ($n = 3$) (MEINL *et al.* 2006), in der Niere

zwischen 0,003-0,013% (n = 7) (MEINL *et al.* 2006), in der Lunge bei etwa 0,016% (n = 1) (eigene Quantifizierung), im Jejunum bei etwa 0,0075% (n = 1) (TEUBNER *et al.* 2007) und im Kolon bei etwa 0,02% (n = 28) (TEUBNER *et al.* 2007). Folglich liegt in der transgenen Linie 7 verglichen mit dem Menschen in der Leber eine etwa 10-60fache, in der Niere eine etwa 90-400fache, in der Lunge eine etwa 30fache, im Jejunum eine etwa 240fache und im Kolon eine etwa 50fache Überexpression der hSULT1A1 vor. Sowohl beim Menschen als auch beim transgenen Mausmodell wird die hSULT1A1 am stärksten in der Leber exprimiert. Im Mausmodell übertrifft die Expressionsstärke in Jejunum und Niere diejenige im Kolon, während beim Menschen die Expression im Kolon höher liegt als in Jejunum und Niere. Ähnlichkeit besteht jedoch zwischen Mensch und Mausmodell im Verhältnis der Expressionsniveaus in Leber und Kolon. Beim Menschen wird drei- bis fünfzehnmal und bei der transgenen Mauslinie fünfmal weniger hSULT1A1 im Kolon als in der Leber exprimiert. Des Weiteren liegen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus die Expressionsstärken in Niere und Jejunum etwa auf dem gleichen Niveau. Ebenfalls der Situation im Menschen entsprach das annähernd gleiche Expressionsniveau bei den männlichen und den weiblichen transgenen Mäusen.

Bei allen drei *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mauslinien lag in den Geweben mit einer starken hSULT1A1-Expression auch ein gut detektierbares SULT1A2-Signal vor. Die hSULT1A1 wurde in der Leber der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 sechsmal, in den weiteren untersuchten Geweben zwischen drei- und fünfmal stärker exprimiert als die hSULT1A2. Im menschlichen Organismus wird die hSULT1A2 ebenfalls in geringerer Stärke exprimiert als die SULT1A1, und ihre Expression konnte auf Proteinebene bisher nur für Leber (MEINL *et al.* 2006) und Caecum (TEUBNER *et al.* 2007) dargestellt werden. MEINL *et al.* (2006) haben für die Expressionsniveaus der beiden Enzyme in der humanen Leber ein SULT1A1/SULT1A2-Verhältnis von etwa sieben gemessen, so dass für die Leber das Verhältnis beider Enzyme zueinander bei Mensch und transgener Mauslinie annähernd übereinstimmt.

Bei der Untersuchung der Expression des humanen Proteins in den drei *hSULT1B1*-transgenen Linien wurde der Schwerpunkt auf den Gastrointestinaltrakt und die Leber gelegt – die Gewebe, für die beim Menschen eine Proteinexpression nachgewiesen worden war (TEUBNER *et al.* 2007). Im Ileum, dem Abschnitt des humanen Gastrointestinaltrakts mit der höchsten SULT1B1-Expression (n = 4) (TEUBNER *et al.* 2007), war bei den transgenen Mauslinien nur bei einem von zwei untersuchten Tieren der Linie 12 eine schwache Expression nachweisbar. Für Magen und Jejunum

wurde beim Menschen eine schwache Expression nachgewiesen (jeweils $n = 1$) (TEUBNER *et al.* 2007), während bei den transgenen Mauslinien nur für Linie 12 eine schwache Expression im Magen und für keine der drei Linien eine Expression im Jejunum gezeigt werden konnte. In der Leber der transgenen Mäuse war, wie beim Menschen ($n = 1$) (TEUBNER *et al.* 2007), in allen drei Linien die Expression deutlich schwächer als in Caecum ($n = 1$) (TEUBNER *et al.* 2007) und Kolon ($n = 28$) (TEUBNER *et al.* 2007). Das bei den transgenen Mauslinien in Caecum und Kolon etwa gleich hohe Expressionsniveau der hSULT1B1 entsprach ebenfalls der Situation im Menschen. Weiterhin war das Expressionsniveau im Kolon von Mauslinie 12, Mauslinie 5 und vom Menschen etwa gleich hoch (Abschnitt 3.3.1.2, Abbildungen 16 und 17). Bei Linie 275 hingegen war die Expressionsstärke in Leber, Caecum und Kolon deutlich niedriger als bei den beiden anderen Linien.

Da die Regulation der hSULT1B1 noch nicht ausreichend charakterisiert worden ist, können nur Annahmen getroffen werden, woran die schwache bzw. fehlende Expression der hSULT1B1 im Magen und Dünndarm der transgenen Linien liegen könnte. Es besteht die Möglichkeit, dass für die Expression notwendige *trans*-wirkende Transkriptionsfaktoren bei der Maus nicht in diesen Geweben exprimiert werden. Auch wäre es möglich, dass zum Erreichen des humanen Expressionsniveaus der hSULT1B1 in den transgenen Mauslinien regulatorische Sequenzbereiche notwendig sind, die auf dem verwendeten Transgen-Konstrukt nicht vorhanden waren. Denkbar wäre eine Steuerung der Expressionsmodulierung über eine sogenannte Locus-Kontroll-Region, die für eine gemeinsame Regulation der hSULT1B1 und der hSULT1E1 zuständig sein könnte, die mit einem Abstand von etwa 80 kb zur SULT1B1 ebenfalls auf dem Chromosom 4 lokalisiert ist.

4.3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation der SULT-Expression

Die zelluläre und die subzelluläre Verteilung der humanen Proteine in den Mauslinien wurden immunhistochemisch untersucht. Das zur Untersuchung der Transgen-Expression bei den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen der Linie 7 verwendete Antiserum C weist eine hohe Sensitivität gegenüber hSULT1A1 und -1A3, jedoch eine nur geringe gegenüber hSULT1A2 auf. Folglich ist in den Schnitten der Gewebe der transgenen Tiere die hSULT1A2 im Verhältnis zu ihrer tatsächlichen Expression zu schwach dargestellt. Für humane Gewebeschnitte, die mit diesem Antiserum untersucht werden, muss hingegen die Anfärbung als Summe der hSULT1A1 und -1A3-spezifischen Anfärbungen betrachtet werden.

In der Leber der transgenen Mäuse war die Immunfärbung homogen über den Azinus verteilt. Es lag eine sowohl zytosolische als auch kernständige Immunfärbung vor. Auch die Zellen des Gallengangepithels waren zytosolisch sowie kernständig immunreaktiv. Eine homogene Expressionsverteilung der SULT1A-Formen über den Azinus war von WINDMILL *et al.* (1998) für die humane Leber auf RNA- und Proteinebene gezeigt worden. Auch in den humanen Hepatozyten scheint zusätzlich zur zytosolischen eine kernständige Expressionslokalisierung vorzuliegen (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse).

Für die Lunge bestand zwischen Mensch und transgenem Modell Übereinstimmung hinsichtlich der Expressionslokalisierung der hSULT1A-Formen in den Epithelzellen des respiratorischen Epithels (WINDMILL *et al.* 1998), (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse) und der hauptsächlich kernständigen Lokalisation in den Pneumozyten des Typs II (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse).

In der Niere der transgenen Mäuse waren, je nach ihrer Lage im Organ, sowohl proximale als auch distale Tubulizellen immunreaktiv. Während im inneren Nierenmark keine Immunfärbung vorlag, war diese im äußeren Cortex nur kernständig, im inneren Cortex sowie im äußeren Mark hingegen sowohl zytosolisch als auch kernständig lokalisiert. Damit stimmte die Verteilung der SULT1A-spezifischen Färbung in der Niere der transgenen Mäuse weitestgehend mit der in der menschlichen Niere überein (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse).

Auch im Pankreas lag eine Übereinstimmung zwischen transgenen Mäusen und Mensch (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse) hinsichtlich der SULT1A-spezifischen Immunfärbung des Gangepithels der Ausführungsgänge vor.

Für das Kolon konnte die übereinstimmende Lokalisation der SULT1A-Immunfärbung bei transgener Maus und Mensch mit zytosolischer und kernständiger Reaktivität in den Epithelzellen des luminal gelegenen Kryptenabschnitts dargestellt werden. WINDMILL *et al.* (1998) beschrieben für das humane Kolon ebenfalls eine SULT1A-spezifische Immunfärbung des Oberflächenepithels der Krypten und TEUBNER *et al.* (2007) eine nukleäre und zytosolische Immundetektion von SULT1A in den luminalen Kryptenzellen. Auch für den Dünndarm stimmte die von Teubner *et al.* für das Ileum bestimmte Expressionslokalisierung der SULT1A-Formen - eine Immunfärbung der reifen Enterozyten, beginnend am Übergang von Krypte zur Zotte - mit dem Expressionsmuster überein, das für die transgenen Mäuse im Jejunum detektiert wurde. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier im Detail charakterisierte

hSULT1A1/1A2-transgene Mauslinie 7 sowohl hinsichtlich der Gewebeverteilung als auch hinsichtlich der zellulären und subzellulären Expressionslokalisation weitgehend mit der für den Menschen nachgewiesenen SULT1A-Verteilung und -Lokalisation übereinstimmt.

Das Antiserum, das zur Untersuchung der Verteilung der Transgen-Expression für das Kolon-Gewebe der *hSULT1B1*-transgenen Linie 12 verwendet wurde, zeigte im Western-Blot (Abbildung 19) Kreuzreaktivitäten mit den murinen *Sult1d1* und *Sult1c2*. Diese waren jedoch so schwach, dass mit der verwendeten Antiserum-Verdünnung in den Kolongewebe-Schnitten der Wildtyp-Maus keine Immunfärbung detektiert wurde. Wie für die *hSULT1A1/1A2* wurde sowohl bei der transgenen Maus als auch beim Menschen eine Lokalisation der *hSULT1B1* in den Epithelzellen in der luminalen Hälfte der Krypten nachgewiesen. Somit liegt für dieses Gewebe beim Menschen und bei der transgenen Mauslinie eine identische zelluläre Verteilung der Expression vor.

Die als zytosolisch beschriebene SULT-Lokalisation hat dazu geführt, dass die Bezeichnung SULT häufig synonym mit „zytosolische Sulfotransferase“ verwendet wird (FALANY 1997; BLANCHARD *et al.* 2004). Damit sollte ursprünglich eine Gegenüberstellung zu den membrangebundenen Sulfotransferasen des Golgi-Apparates erfolgen, die nicht zu den Enzymen des Fremdstoffmetabolismus gehören. Allerdings ergaben verschiedene Untersuchungen eine auch kernständige Lokalisation verschiedener SULT-Formen. So detektierten MANCINI *et al.* (1992) eine Lokalisation der EST in den Zellkernen einer beschränkten Anzahl von Rattenhepatozyten und WHITNALL *et al.* (1993) in den Zellkernen der Nebennierenrinde von Meerschweinchen. RAJKOWSKI *et al.* (1997) wiesen eine höhere spezifische DHEA-Sulfotransferaseaktivität in der Kernfraktion als in der zytosolischen Fraktion von Rattenhirngewebe nach. HE *et al.* (2004; 2005) zeigten eine Lokalisation der SULT2B1b – sowie deren katalytische Aktivität – in den Nuklei von humanen reifen Plazentazellen (Synzytiotrophoblasten), während dieselbe SULT-Form in humanen Prostatazellen und Zellen des humanen Bronchialepithels ausschließlich zytosolisch und in normalem Brustgewebe sowie Brustkrebsgewebe zytosolisch als auch kernständig, lokalisiert wurde. Damit zeigten sie als erste die kernständige Lokalisation einer humanen SULT-Isoform. Die Autoren schlugen vor, die kernständige Lokalisation in den Synzytiotrophoblasten könnte dazu dienen, eine Bindung und selektive Aktivierung von Steroidrezeptoren in den Nuklei zu verhindern. Unter den humanen SULT-Formen trägt die SULT2B1b als einzige eine prolin- und serinreiche Aminosäuresequenz an ihrem carboxylischen Ende, die unter anderem einer Translokation des Proteins in den Zellkern zu dienen scheint (HE und FALANY

2006). Von TEUBNER *et al.* (2007) wurde eine kernständige Lokalisation der hSULT1A-Formen für die Enterozyten des humanen Kolons beschrieben, die in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Unveröffentlichte Ergebnisse der Abteilung ETOX zeigten des Weiteren eine SULT1A-Lokalisation in den Nuklei humaner Hepatozyten, den Pneumozyten des Typs II und den Tubulizellen der Niere. Bisher liegen weder Kenntnisse über den Mechanismus der Verlagerung der SULT-Formen in den Nukleus noch zu der physiologischen Funktion dieser Enzyme im Zellkern vor.

4.3.3 Aktivitätsnachweis für das heterolog exprimierte Enzym SULT1A1

Die katalytische Aktivität von Leber- und Kolonzytosolen transgener Mäuse der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 und einer Wildtyp-Maus hinsichtlich des typischen Substrats der humanen SULT1A1 und SULT1A2 4-Nitrophenol wurde vergleichend untersucht. Es zeigte sich, dass die Aktivität in den Leberproben der transgenen Mäuse 30mal und in den Kolonproben 50mal höher war als in den jeweiligen Proben der Wildtyp-Maus. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die heterolog exprimierten Proteine im Zytosol der transgenen Mäuse ihre korrekte Konformation einnehmen, die es ihnen ermöglicht, ihre katalytische Wirkung zu entfalten.

Mit den verwendeten proteinbiochemischen Methoden konnte gezeigt werden, dass in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen der Linie 7 enzymatisch aktive humane SULT mit etwa der gleichen zellulären, subzellulären und Gewebe-Verteilung exprimiert werden wie beim Menschen. Aufgrund der hohen Kopienzahl des Transgens liegt jedoch eine ausgeprägte Überexpression der humanen Proteine vor.

4.4 Genotoxizitätsexperimente mit *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen

4.4.1 1-HMP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen

Bisherige Tierversuche zur Untersuchung des Niveaus bzw. der Verteilung 1-HMP- sowie 1-SMP-induzierter DNA-Addukte waren mit Ratten als Versuchstieren durchgeführt worden (MA 2001; DONATH 2008). Die Resultate jener Versuche wurden zur Festlegung der Bedingungen des in dieser Arbeit durchgeführten Experiments herangezogen. Es hatte sich gezeigt, dass ein Versuchszeitraum von 0,5 h ausreichte, um maximale Adduktwerte in den Rattengeweben zu erhalten. Trotzdem wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Adduktwerte nach einem Versuchszeitraum von 3 h untersucht, um die Persistenz der Addukte einschätzen zu können. Die in ersten Versuchen bei Ratten verwendete 1-HMP-Dosis von 250 $\mu\text{mol/kg KG}$ war in späteren Versuchen auf 83,3 $\mu\text{mol/kg KG}$ reduziert worden, da letztere Dosis ebenfalls noch gut detektierbare Adduktniveaus in den zu untersuchenden Geweben erzielte. Sie wurde daher auch in dieser Arbeit verwendet.

Aufgrund der geringen Tierzahl ist der Versuch als Vorstudie zu einem umfangreicheren Tierexperiment einzustufen. Da bisher keine Daten für die Maus vorlagen, sollten Niveau und Gewebeverteilung der von 1-HMP induzierten DNA-Addukte in dieser Spezies untersucht werden. Weiterhin sollten Adduktniveau und Gewebeverteilung zwischen Wildtyp- und *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen verglichen werden, um den Einfluss dieser humanen SULT auf die 1-HMP-Aktivierung einschätzen zu können.

Hier soll zunächst die Adduktverteilung in den Wildtyp-Mäusen diskutiert und ins Verhältnis zu vorliegenden Ratten-Studien gesetzt und im Anschluss der Einfluss der Transgene auf das Adduktniveau betrachtet werden.

Bei den Wildtyp-Mäusen wurden nach 0,5 h die höchsten Adduktwerte mit etwa 200 Addukten pro 10^8 Nukleotide in Caecum und Leber gemessen. Es folgten in absteigender Reihenfolge Duodenum, Niere, Lunge und Milz. In Jejunum, Ileum und Kolon befanden sich die Adduktniveaus im Bereich der Nachweisgrenze. Nach 3 h lag im Caecum die verhältnismäßig geringste Abnahme im Adduktniveau vor (um den

Faktor 3), während das Adduktniveau in der Lunge fünfmal, in der Leber siebenmal und in der Niere dreizehnmal niedriger war als nach 0,5 h.

Demnach sind mausspezifische Prozesse in der Lage, 1-HMP zu einem Mutagen zu aktivieren. Sulfotransferasen sind die einzigen Enzyme, für die bezüglich 1-HMP der Zusammenhang von enzymatischer Aktivität und der Entstehung benzylicher DNA-Addukte sowie einer mutagenen Wirkung gezeigt worden ist (SURH *et al.* 1990; GLATT *et al.* 1994; SURH und MILLER 1994; GLATT 2003). Daher wurde in dieser Arbeit von ihrer Wirkung als Ursache für die 1-HMP-vermittelte DNA-Adduktbildung ausgegangen. Ob dabei Aktivierung und DNA-Bindung in derselben Zelle stattfinden, kann nicht definitiv gesagt werden. 1-SMP ist relativ kurzlebig ($t_{1/2}$ etwa 3 min bei 37°C) (GLATT 2003) und kann aufgrund seiner Ladung nur mittels aktiver Prozesse aus der Zelle, in der es gebildet wurde, transportiert werden. Für Ratten kann vom Vorhandensein solcher Prozesse ausgegangen werden, da nach Verabreichung von 250 µmol/kg KG 1-HMP an Ratten nach 180 min 0,53 µmol/l 1-SMP im Blutplasma der Tiere detektiert werden konnten (GLATT 2003). Im Blutserum kann 1-SMP durch reversible Bindung an Blutproteine wie Albumin stabilisiert werden, so dass sich die Halbwertszeit des Zerfalls bis zu 990 min verlängert (MA *et al.* 2003).

Die Höhe des Adduktniveaus in einem Gewebe wird durch diverse Faktoren wie Zufuhr des Adduktvorläufers, Unterschiede in adduktbildenden oder fremdstoffabbauenden Prozessen, aber auch der Geschwindigkeit und Effizienz des Adduktabbau beeinflusst. Nach intraperitonealer Applikation gelangt 1-HMP über Blut bzw. Lymphe in die Leber, die somit dem 1-HMP-Metabolismus der anderen Organe und Gewebe vorgeschaltet ist. In der Leber von Mäusen werden mSult1a1 (Weibchen > Männchen), mSult1d1 (Weibchen > Männchen) und mSult2a1/2 (nur Weibchen) deutlich exprimiert (ALNOUTI und KLAASSEN 2006). Um den Einfluss dieser Sult-Formen auf die 1-HMP-Aktivierung beurteilen zu können, wurde die Aktivierung von 1-HMP in *Salmonella typhimurium*-Stämmen, die verschiedene murine Sulfotransferasen exprimieren, im Ames-Test vergleichend untersucht. Die stärkste Aktivierungskapazität wurde für Sult1e1 (14 000 Revertanten/nmol Substanz über der Kontrolle) sowie Sult1a1 (4400 Revertanten/nmol) gemessen, während Sult1b1, Sult1d1 und Sult2a1 1-HMP nur schwach aktivieren konnten (15, 30 bzw. 150 Revertanten/nmol) (GLATT 2003); ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Da mSult1e1 nicht und mSult1b1 kaum in der Leber exprimiert wird (ALNOUTI und KLAASSEN 2006), könnten mSult1a1, mSult1d1 und bei weiblichen Tieren mSult2a1 an der 1-HMP-Aktivierung in der Leber beteiligt sein.

In der Lunge werden mSult1a1 und mSult1d1 exprimiert, während in der Niere vor allem mSult1d1, aber auch mSult1c2, zu der keine Ames-Test-Daten vorliegen, und in geringerer Stärke mSult1a1 exprimiert werden (ALNOUTI und KLAASSEN 2006).

Betrachtet man den Verlauf der Adduktniveaus entlang des Verlaufs des Intestinaltrakts der Mäuse, so fällt auf, dass im Duodenum etwa 100 Addukte pro 10^8 Nukleotide gemessen, in den darauf folgenden Abschnitten Jejunum und Ileum jedoch kaum bzw. keine Addukte detektiert wurden. Im anschließenden Caecum hingegen wurde der höchste Adduktwert mit 195 Addukten pro 10^8 Nukleotide beim Wildtyp detektiert. Im nachfolgenden Kolon wurden wiederum nahezu keine Addukte gefunden. Ob diese starken Unterschiede des Adduktniveaus im Verlauf des Darmtrakts sich als statistisch signifikant erweisen, muss in Zukunft untersucht werden. Die murinen Sult1e1 und Sult1a1 werden im Gastrointestinaltrakt nur im Jejunum (schwach) bzw. im Kolon, wo jeweils kein erhöhtes Adduktorkommen gemessen wurde, exprimiert (ALNOUTI und KLAASSEN 2006; ENOKIZONO *et al.* 2007). Die murine Sult1d1 wird nach Alnouti *et al.* gleichmäßig über den Gastrointestinaltrakt hinweg verteilt exprimiert, während Enokizono *et al.* eine deutlich höhere Expression im Kolon als in Duodenum, Jejunum und Ileum zeigten. Mit kürzlich erzeugten *mSult1d1*-k.o.-Mauslinien wird der Einfluss der mSult1d1 auf die 1-HMP-vermittelte Adduktbildung in Zukunft untersucht werden können.

Auch von den anatomischen bzw. physiologischen Eigenschaften von Duodenum und Caecum könnte ein Einfluss auf die erhöhten Adduktniveaus in diesen Darmabschnitten ausgehen. So mündet der Gallengang ins Duodenum, so dass dieser Darmabschnitt als erster den über die Galle ausgeschiedenen, möglicherweise noch reaktiven oder reaktivierten 1-HMP-Metaboliten ausgesetzt ist. Im Caecum wird der Darminhalt von der dort angesiedelten Bakterienflora aufgeschlossen. Unter den von weiblichen Ratten mit Urin und Faeces ausgeschiedenen 1-HMP-Metaboliten lag der Anteil des 1-HMP-Glucuronsäure-Konjugats bei 7%. Bei 3% lag der Anteil der Ausgangssubstanz 1-HMP, die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch mikrobielle β -Glucuronidase aus dem Glucuronsäurekonjugat freigesetzt wurde (MA 2001). Es wäre möglich, dass ein weitaus größerer Anteil des 1-HMP als 1-HMP-Glucuronid biliär sezerniert wird. Durch die mikrobielle β -Glucuronidase-Aktivität freigesetztes 1-HMP könnte von den Mukosazellen des Darms absorbiert und von den in diesen Zellen exprimierten Sult-Formen aktiviert werden.

Zur Untersuchung der 1-HMP-vermittelten DNA-Adduktbildung in Ratten wurden vier unterschiedliche Studien durchgeführt. Dabei lagen die Versuchszeiträume zwischen 15 min und 3 h, es wurden 250 sowie 83,3 $\mu\text{mol/kg KG}$ i.p. verabreicht und Leber, Niere, Lunge und Kolon auf DNA-Addukte untersucht (MA 2001; GLATT 2003; DONATH 2008). Das höchste Adduktniveau mit 900 Addukten pro 10^8 Nukleotide wurde bei Verabreichung von 250 $\mu\text{mol/kg KG}$ nach 15 min in der Niere der Ratten gemessen, während unter gleichen Bedingungen die Adduktwerte für Leber und Lunge nur bei 320 bzw. 110 Addukten pro 10^8 Nukleotide lagen (GLATT 2003). Bei Verabreichung von 83,3 $\mu\text{mol/kg KG}$ 1-HMP lagen nach 1,5 h Adduktwerte von 419, 332 und 118 Addukten pro 10^8 Nukleotide in Leber, Niere und Lunge vor (DONATH 2008). Damit war in diesem Versuch das Adduktniveau bei den Ratten, trotz des späteren Tötungszeitpunktes, deutlich höher als bei den Wildtyp-Mäusen, während die Reihenfolge der Adduktniveaus in den Organen bei Ratten und Mäusen übereinstimmte. Im Kolon der Ratten waren bei Verabreichung von 250 $\mu\text{mol/kg KG}$ 1-HMP nach 3 h keine DNA-Addukte nachweisbar (DONATH 2008). Auch dieses Ergebnis entsprach der Situation in den Mäusen, für die das Adduktniveau im Kolon mit 6 Addukten pro 10^8 Nukleotide knapp über der Nachweisgrenze lag. Das Caecum war in den Rattenversuchen nicht untersucht worden, so dass das in den Mäusen beobachtete hohe Adduktniveau in diesem Darmabschnitt nicht mit der Situation in der Ratte verglichen werden konnte. Die großen Unterschiede in der Effektivität, mit der die spezifischen SULT-Formen 1-HMP zu einem Mutagen aktivieren, könnten Unterschiede in den Adduktniveaus zwischen den beiden Nagerspezies bewirken. Beispielsweise lag die Aktivierungskapazität der murinen Sult2a1 im Ames-Test bei 150 Revertanten pro nmol Substanz über der Kontrolle, bei der Ratte hingegen bei 2300 Revertanten, während die murine Sult1a1 einen Wert von 4400 Revertanten, die der Ratte jedoch nur 500 Revertanten pro nmol Substanz über der Kontrolle erreichte (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die stärkste Befähigung zur Aktivierung von 1-HMP zeigte in diesem Testsystem jedoch mit 22000 Revertanten pro nmol Substanz über der Kontrolle die humane SULT1A1. Die Wirkung ihrer Expression in den Geweben der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse auf das 1-HMP-vermittelte Adduktniveau wurde untersucht und mit den Adduktwerten in den Geweben der Wildtyp-Mäuse verglichen. Das Adduktniveau in Leber, Niere und Lunge der transgenen Mäuse war mit 610, 420 bzw. 180 Addukten pro 10^8 Nukleotide drei- bis fünfmal höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Somit war der Zusammenhang zwischen Expression der humanen SULT1A1 und erhöhten Adduktwerten in diesen Geweben klar erkennbar. Im Intestinaltrakt trat dieser Zusammenhang

beim Abschnitt Jejunum deutlich hervor. Hier lag das Adduktniveau bei den transgenen Mäusen bei 120 Addukten pro 10^8 Nukleotide, während bei einer der Wildtyp-Mäuse keine Addukte nachweisbar waren und beim zweiten Tier mit 10 Addukten pro 10^8 Nukleotide die Nachweisgrenze nur knapp überschritten wurde.

Im Duodenum, dem Darmabschnitt, in dem die transgenen Mäuse keine *hSULT1A1* exprimieren, lag das Adduktniveau bei den Wildtyp-Mäusen etwa gleich hoch wie bei den transgenen Mäusen. Im Ileum und Kolon hingegen lag das Adduktniveau bei den transgenen Mäusen, trotz starker Expression der humanen Gene, ähnlich wie bei den Wildtyp-Mäusen kaum über der Nachweisgrenze. Im Caecum lag zwar das dritthöchste Adduktniveau unter den untersuchten Geweben der transgenen Mäuse vor, dennoch war es, trotz der starken *hSULT1A1/1A2*-Expression, etwa so hoch wie bei den Wildtyp-Mäusen. Mögliche Erklärungen dafür wären, dass in diesen Geweben nicht die Sult- bzw. SULT-Expression, sondern die Konzentration des benötigten Co-Faktors PAPS oder des von den Zellen aufgenommenen 1-HMP den Ablauf der Aktivierungsreaktion limitieren. Auch wäre möglich, dass nicht die 1-HMP-Aktivierung vor Ort, sondern die Aufnahme von mit dem Blutstrom transportiertem 1-SMP das Adduktniveau bestimmt.

Der Vergleich der Adduktwerte bei den transgenen Mäusen zu den Zeitpunkten 0,5 h und 3 h nach 1-HMP-Applikation zeigte, dass sich im Caecum das Adduktniveau nur um den Faktor 2 verringert hatte. Damit lag in diesem Gewebe, wie bei den Wildtyp-Mäusen, der niedrigste Adduktabbau vor. In der Niere hingegen wurden, ebenfalls wie bei den Wildtyp-Mäusen, die Addukte am effektivsten abgebaut (Reduktion um den Faktor 13 bei den Wildtyp- und den Faktor 20 bei den transgenen Mäusen). Aufgrund der ausgeprägten Adduktreduktion in der Niere übertraf nach 3 h das Adduktniveau in der Lunge der transgenen Mäuse dasjenige in der Niere um das dreifache. Dadurch änderte sich die Reihenfolge der Gewebe mit den höchsten Adduktniveaus von „Leber > Niere > Caecum > Lunge“ nach 0,5 h zu „Caecum > Leber > Lunge > Niere“ nach 3 h. Aufgrund des verhältnismäßig hohen Adduktniveaus sowie dessen langer Persistenz könnte sich das Caecum als besonders anfällig für adduktbedingte DNA-Schädigungen erweisen. Die effiziente DNA-Adduktreparatur in der Niere hingegen könnte im transgenen *hSULT1A1/1A2*-Mausmodell mechanistisch untersucht werden.

4.4.2 PhIP-DNA-Addukte in transgenen und Wildtyp-Mäusen

In dieser Arbeit wurde die genotoxische Wirkung des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP im *hSULT1A1/1A2*-Mausmodell untersucht und mit seiner Wirkung im Wildtyp verglichen. PhIP, wie auch die übrigen HAA, werden nach ihrer Aufnahme in den Organismus in komplexer Weise über verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert oder bioaktiviert. Der Metabolismus von PhIP ist in zahlreichen Studien sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell sowie in Humanstudien untersucht worden. PhIP selbst ist nicht reaktiv, sondern wird erst nach metabolischer Aktivierung zu einem Mutagen. Dabei wurde als primärer Schritt der Bioaktivierung zum proximalen Mutagen die *N*-Hydroxylierung der exozyklischen Aminogruppe durch das hepatisch exprimierte hCYP1A2 nachgewiesen, und, in einem geringeren Ausmaß, durch hCYP1A1 und hCYP1B1, die in zahlreichen extrahepatischen Geweben exprimiert werden (WALLIN *et al.* 1990; BOOBIS *et al.* 1994; EDWARDS *et al.* 1994; BOOBIS *et al.* 1995; SHIMADA *et al.* 1996; CROFTS *et al.* 1997; CROFTS *et al.* 1998). Auch bei Mäusen können neben Cyp1a2 noch weitere Cyp-Formen die *N*-Hydroxylierung von PhIP vermitteln. CHEN *et al.* (2007) wiesen nach, dass in *mCyp1a2*-k.o.-Mäusen das *N*³-Glucuronid von *N*-Hydroxy-PhIP noch immer einen der Hauptmetaboliten von PhIP darstellt.

Speziesunterschiede im Phase I-Metabolismus von PhIP sind ein Beispiel für die Problematik, die die Verwendung von Tiermodellen bei der Untersuchung der Metabolisierung von Xenobiotika mit sich bringt. So ist die beim Menschen vorrangige Oxidationsreaktion die *N*-Hydroxylierung der exozyklischen Aminogruppe von PhIP zum proximalen Mutagen durch hCYP1A2, während bei Nagern ein weitaus größerer Anteil des PhIP vom homologen Enzym an der Phenylgruppe hydroxyliert und damit detoxifiziert wird (BUONARATI *et al.* 1992; LIN *et al.* 1995; MALFATTI *et al.* 1999; TURESKY *et al.* 1999; LANGOUET *et al.* 2002; KULP *et al.* 2004). Zur Darstellung dieser Speziesunterschiede und um den Phase I-Metabolismus von PhIP in einem Tiermodell untersuchen zu können, das dem humanen Metabolismus näher kommt, haben CHEUNG *et al.* (2005a) humanisierte Mauslinien für *hCYP1A1* und *hCYP1A2* erstellt, in denen die entsprechenden murinen Gene deletiert waren. Bei der vergleichenden Untersuchung der *hCYP1A2*-transgenen-*mCYP1a2*-k.o.-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen wurde bei den humanisierten Tieren eine zweifache Abnahme der Exkretion von 4'-Hydroxy-PhIP und eine vierfache Zunahme der Exkretion von *N*-Hydroxy-PhIP nachgewiesen.

Die Umsetzung von PhIP zum ultimalen Mutagen kann über eine NAT- oder SULT-vermittelte Konjugation der *N*-Hydroxylgruppe verlaufen, bei der reaktive Essig-

bzw. Schwefelsäureester entstehen. Spontane Abspaltung eines Acetat- bzw. Sulfatons generiert ein hochreaktives Kation, das an zelluläre Nukleophile wie DNA oder Proteine binden kann (BUONARATI und FELTON 1990; FRANSEN *et al.* 1992; KADERLIK *et al.* 1994a). Zwar konnte bisher, vermutlich aufgrund der extrem kurzen Halbwertszeit dieser reaktiven Verbindung, kein Nachweis von *N*-Sulfoxy-PhIP erfolgen, doch legen verschiedene Studien indirekt dessen Bildung bei einer SULT-vermittelten PhIP-Aktivierung nahe. Beispielsweise haben BUONARATI und FELTON (1990) einen Anstieg der Mutagenität von PhIP im Ames-Test durch Zugabe von PAPS, nicht jedoch von Acetyl-CoA, zu mit Zytosol angereicherteren Mikrosomenpräparationen aus Mäuselebern gemessen. MUCKEL *et al.* haben die humanen NAT1, NAT2 und SULT1A1 im Acetyltransferase-defizienten *Salmonella*-Stamm TA1538/1,8-DNP exprimiert. Während *N*-Hydroxy-IQ effizient von hNAT2 aktiviert wurde, wurde *N*-Hydroxy-PhIP nicht durch die humanen NAT, aber durch hSULT1A1 (MUCKEL *et al.* 2002) und durch hSULT1A2 (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse) zu einem Mutagen umgesetzt. Demnach scheint beim Menschen in erster Linie die SULT-vermittelte Umsetzung von *N*-Hydroxy-PhIP der Metabolismusweg zu sein, der aus PhIP das ultimale Mutagen generiert.

Der Grund für die Erstellung transgener Mauslinien für humane *SULT*-Gene waren die ausgeprägten Speziesunterschiede, die für diese Enzyme hinsichtlich Substratspezifität, Gewebeverteilung und Expressionsniveau existieren. Diese Speziesunterschiede konnten für PhIP *in vitro* dargestellt werden: im Ames-Test wurde *N*-Hydroxy-PhIP zwar von den humanen SULT1A1 und SULT1A2 sowie - in geringerem Umfang - von der murinen Sult1d1 zu einem Mutagen aktiviert, nicht jedoch von der murinen Sult1a1 (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei der Untersuchung der Mutagenität oder Kanzerogenität von PhIP im Mausmodell wird somit zum einen erheblich weniger des proximalen Mutagens *N*-Hydroxy-PhIP als im Menschen gebildet, zum anderen wird *N*-Hydroxy-PhIP nicht durch das murine orthologe Enzym zum ultimalen Mutagen umgesetzt. Daher sollte in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen untersucht werden, ob die zusätzliche Expression der humanen *SULT*-Gene eine Steigerung der genotoxischen Wirkung von PhIP im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verursacht und in welchen Geweben sich die Wirkung der humanen SULT-Expression in Form von DNA-Addukten manifestiert.

4.4.2.1 Tierversuch

Um die genotoxische Wirkung von PhIP zu bestimmen, wurden die PhIP-DNA-Addukte in verschiedenen Geweben von transgenen und Wildtyp-Mäusen nach oraler Verabreichung einer einmaligen Dosis PhIP von 90 mg/kg KG in wässriger Lösung gemessen. Der Nachweis von DNA-Addukten ist ein Indikatorrest zur Erfassung der genotoxischen Wirkung einer Substanz, bei dem ein früher Endpunkt für primäre DNA-Schäden bestimmt wird. Zwar kann ein Großteil der DNA-Addukte von den zelleigenen DNA-Reparatursystemen erkannt und entfernt werden. Falls die Reparatur jedoch nicht rechtzeitig erfolgt oder fehlerhaft ausgeführt wird, können aus der DNA-Bindung Mutationen resultieren. Die Korrelation der Zahl an DNA-Addukten mit der Mutationsfrequenz konnte experimentell bestätigt werden (MAHER *et al.* 1989). Des Weiteren können DNA-Addukte die Stabilität der DNA beeinflussen und zu Strangbrüchen führen.

Als Methode zum Nachweis der PhIP-DNA-Addukte wurde das ³²P-Postlabelling verwendet. Im Rahmen der Doktorarbeit von H. Hollnagel war die entsprechende Methodik etabliert worden (HOLLNAGEL 2004) und es stand mit PhIP adduktierter DNA als Standard zur Verfügung. Zur Bestimmung des Adduktniveaus in den Geweben wurde die Intensität eines Flecks des durch Dünnschichtchromatographie autoradiographisch sichtbar gemachten Adduktmarkers von PhIP gemessen. Dass es sich bei diesem Fleck um PhIP-C8-dG handelt, war von mehreren Autoren (FRANSEN *et al.* 1992; LIN *et al.* 1992; HOLLNAGEL 2004) bestätigt worden. Weitere, im ³²P-Postlabelling-Chromatogramm PhIP-addukturter DNA-Proben vorhandene Adduktmarker waren als Nukleotid-Oligomere identifiziert worden, die am 5'-Ende ein adduktierteres dG tragen (FUKUTOME *et al.* 1994; PFAU *et al.* 1994). Es konnte keine Adduktbildung von PhIP mit dT, dA oder dC festgestellt werden (FRANSEN *et al.* 1992; LIN *et al.* 1992; PFAU *et al.* 1994).

Die den Mäusen verabreichte Dosis von 90 mg/kg KG PhIP war ebenfalls im Rahmen der Doktorarbeit von H. Hollnagel an nicht-transgenen Ratten als Hochdosis zur oralen Verabreichung definiert worden, die sich hinsichtlich der resultierenden DNA-Adduktniveaus noch im linearen Dosis-Wirkungsbereich befindet (HOLLNAGEL 2004). Der Einsatz einer Hochdosis war notwendig, um die eventuellen Unterschiede im DNA-Adduktniveau zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen mit der zur Verfügung stehenden Methodik des ³²P-Postlabelling auch in Geweben mit niedrigen Adduktniveaus noch detektieren zu können. Es wurde jedoch mittels Accelerator Mass

Spectrometry nachgewiesen, dass auch nach nahrungsrelevanten PhIP-Dosen im Kolon des Menschen DNA-Addukte vorzufinden sind (DINGLEY *et al.* 1999) und es wurde gezeigt, dass sich das Metabolitenprofil von PhIP im Urin von Mäusen bei Gabe einer Hoch- und einer Niedrigdosis entsprach (CHEN *et al.* 2007).

Anhand der in zwei Vorversuchen ermittelten Daten wurden die Bedingungen für die Durchführung des Hauptversuchs festgelegt. Da zwischen männlichem und weiblichem Tier keine Unterschiede im Adduktniveau gemessen wurden und das Adduktniveau im Kolon beim transgenen Tier vom Zeitpunkt vier Stunden zum Zeitpunkt acht Stunden anstieg, nach 24 Stunden jedoch abgefallen war, wurden für den Hauptversuch männliche Mäuse eingesetzt und acht Stunden nach Applikation als Tötungszeitpunkt festgelegt. Die Optimierung der im ^{32}P -Postlabelling-Experiment zu verwendenden DNA-Menge war notwendig, da für PhIP keine Anreicherung der adduktierten Nukleotide mit Butanol, Nuklease P1 oder S1 möglich war (HOLLNAGEL 2004). Folglich reicht bei Einsatz größerer DNA-Mengen die verwendete Radioaktivität nicht aus, um die adduktierten Nukleotide quantitativ zu markieren. Daher führt der Einsatz größerer DNA-Mengen zu relativ geringeren Werten addukturierter Nukleotide und könnte den nachzuweisenden Unterschied in den Adduktniveaus zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen maskieren.

Im Hauptversuch wurden die PhIP-DNA-Adduktniveaus in Leber, Niere, Lunge, Milz sowie der Mukosa von Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon in *hSULT1A1/1A2*-transgenen und Wildtyp-Mäusen vergleichend untersucht. Signifikant erhöhte Adduktniveaus wurden in Leber, Lunge, Kolon, Niere und Milz der transgenen Mäuse gemessen. Im Ileum waren die Adduktniveaus bei den transgenen Tieren zwar höher als bei den Wildtypen, jedoch waren sie bei der untersuchten Tierzahl nicht signifikant verschieden. Im Jejunum und Caecum waren die Adduktniveaus bei Transgenen und Wildtypen etwa gleich hoch.

4.4.2.2 PhIP-DNA-Addukte in der Leber

Es konnte gezeigt werden, dass die in den transgenen Mäusen heterolog exprimierte humane SULT1A1 in der Lage ist, PhIP *in vivo* zum ultimalen Mutagen umzusetzen. Dieses Vermögen der hSULT1A1 wurde am ausgeprägtesten in der Leber der transgenen Mäuse deutlich. In diesem Organ lag bei den Wildtyp-Mäusen das niedrigste, bei den transgenen Mäusen mit einem – verglichen mit dem Wildtyp – 17fachen Anstieg jedoch das höchste Adduktniveau vor.

In Tierversuchen, bei denen PhIP an Ratten verabreicht wurde, wurde entsprechend der Situation in den Wildtyp-Mäusen das niedrigste Adduktniveau in der Leber gemessen. Die Reihenfolge der Adduktniveaus nach 24 h bei Verabreichung von 90 mg/kg KG PhIP stellte sich bei männlichen F344-Ratten folgendermaßen dar: Kolon-Mukosa > Lunge > Caecum-Mukosa > Dünndarm-Mukosa > Niere > Leber (HOLLNAGEL 2004). KADERLIK *et al.* (1994a) fanden im gleichen Ratten-Stamm nach Verabreichung von 50 mg/kg KG PhIP für Kolon, Lunge und Leber dieselbe Reihenfolge der Adduktbelastung. Bei männlichen Wistar-Ratten war bei Verabreichung von 90 mg/kg PhIP die Reihenfolge der Adduktniveaus: Lunge > Caecum-Mukosa > Kolon-Mukosa > Niere, in der Leber war das Adduktniveau jedoch abermals am niedrigsten (HOLLNAGEL 2004).

Mikrosomen der Rattenleber können *in vitro* PhIP zu einem Mutagen aktivieren (HOLLNAGEL 2004). Die murine, in der Leber konstitutiv exprimierte CYP1a2 kann - wenn auch in geringerem Umfang als die humane Isoform - PhIP zum proximalen Mutagen *N*-Hydroxy-PhIP umsetzen (CHEUNG *et al.* 2005a). Dass trotzdem die Leber bei Ratten und Wildtyp-Mäusen das Gewebe mit der niedrigsten Adduktbelastung ist, kann an der Vielzahl der lebereigenen Detoxifizierungsmechanismen liegen.

Einen dieser Schutzmechanismen stellt die GST-vermittelte Reduktion einer Verbindung oder ihre Konjugation mit GSH dar. In der Leber der Ratte liegen eine hohe GSH-Konzentration sowie eine ausgeprägte Expression mehrerer GST vor (VAN LIESHOUT *et al.* 1997; VAN LIESHOUT *et al.* 1998). Sowohl humane als auch Ratten-GST sind in der Lage, das ultimale Mutagen *N*-Acetoxy-PhIP wieder zu PhIP zu reduzieren (LIN *et al.* 1994; COLES *et al.* 2001). Ratten-Hepatozyten wurden von KADERLIK *et al.* (1994b) vor der Inkubation mit PhIP mit 1-Bromheptan und Buthioninsulfoximin – zwei Verbindungen, die GSH-depletierend wirken und dessen erneute Synthese verhindern – vorbehandelt. Dies bewirkte einen 15fachen Anstieg der PhIP-DNA-Addukte in den Zellen. Der 15fache Anstieg der DNA-Addukte durch GSH-Depletion liegt in der gleichen Größenordnung wie der 17fache Anstieg der DNA-Addukte in der Leber der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Lebern der Wildtyp-Mäuse. Man könnte diese Ergebnisse mit folgenden Überlegungen zu einander ins Verhältnis setzen:

Im *in vitro* Experiment wird der Anteil des proximalen Mutagens *N*-Hydroxy-PhIP, der nicht durch Glucuronidierung detoxifiziert wurde, durch SULT- oder NAT-Konjugation zur DNA-reaktiven Verbindung umgesetzt. Bei Depletion von GSH kann ein größte-

rer Anteil dieser instabilen Konjugate in der Bildung von DNA-Addukten resultieren. In der Leber der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Maus steht dem GSH/GST-System ein hoher Überschuss an *hSULT1A1* gegenüber, die in der Lage ist, in großer Menge das instabile *N*-Sulfoxy-PhIP zu generieren. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass die Instabilität des Schwefelsäureesters ihn als GST-Substrat ungeeignet macht, zum anderen könnte es sein, dass das GST/GSH-System einem Überschuss an reaktivem Metaboliten gegenübersteht und entsprechend der *in vitro*-Situation eine GSH-Depletion resultiert. Dies könnte die gleiche Größenordnung des Adduktanstiegs in zwei unterschiedlichen Systemen erklären, in denen jeweils die Menge des gebildeten *N*-Hydroxy-PhIP, die nicht glucuronidiert wird, die Substratmenge für die toxisierenden Enzyme limitiert.

Auch der UGT-vermittelte Metabolismus von *N*-Hydroxy-PhIP könnte bei einer hohen Überexpression von *hSULT1A1*, wie sie in der Leber der transgenen Mäuse vorliegt, vermindert sein. SULT zeigen oft eine hohe Affinität zu ihren Substraten, jedoch eine niedrige Kapazität des Umsatzes (KIM *et al.* 1995). Dagegen weisen UGT eine eher niedrige Substrataffinität, jedoch eine höhere Umsatzkapazität auf (COURT *et al.* 2001). Bei hohen Substratkonzentrationen sollte daher die UGT-vermittelte Konjugation mit Glucuronsäure vorherrschend sein, während bei einer hohen Enzymexpression wie in den transgenen Mäusen die möglicherweise höhere Affinität der SULT zum *N*-Hydroxy-PhIP bewirken könnte, dass dieses den UGT nur in sehr geringem Umfang als Substrat zur Verfügung steht.

4.4.2.3 Extrahepatische PhIP-DNA-Addukte

In den extrahepatischen Geweben könnte bei Vorliegen geeigneter Enzyme die Aktivierung von PhIP über einen gewebeeigenen Phase I- und Phase II-Metabolismus verlaufen. Es ist jedoch ebenso möglich, dass in der Leber gebildetes *N*-Hydroxy-PhIP in die Gewebe transportiert und dort weiter aktiviert wird. Auch eine Verteilung des in der Leber gebildeten, reaktiven *N*-Sulfoxy-PhIP im Organismus, mit einer Adduktbildung in extrahepatischen Geweben, sowie eine Kombination aller Mechanismen, wären denkbar. Da sowohl PhIP als auch *N*-Hydroxy-PhIP im Urin von Mäusen detektiert werden konnten, ist von einer systemischen Bioverfügbarkeit beider Substanzen auszugehen (CHEN *et al.* 2007).

4.4.2.3.1 PhIP-DNA-Addukte in der Lunge

Wie in der Leber bewirkt die Expression der hSULT1A1 in den transgenen Mäusen nach PhIP-Exposition eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Adduktbelastung im Lungengewebe. Die Expression des Transgens wirkte sich jedoch hier, mit einem im Verhältnis zum Wildtyp vierfach erhöhtem Adduktniveau, weniger stark aus als in der Leber, obwohl wie in der Leber eine im Vergleich zum humanen Gewebe starke Überexpression des Transgens gemessen worden war (10-60fach für die Leber, 30fach für die Lunge, Ergebnisse Diplomarbeit N. Schade). Es ist möglich, dass durch die Leber schon ein großer Teil des PhIP metabolisch „abgefangen“ wurde, sei es durch Adduktbildung in der Leber, durch metabolische Detoxifizierung und Exkretion mit der Galle oder durch Abgabe der detoxifizierten Metaboliten an das System, damit sie über den Urin ausgeschieden werden können.

Das Expressionsmuster von Cyp1a1 und Cyp1a2 bzw. CYP1A1 und CYP1A2 in der Lunge ist bei Maus und Mensch ähnlich. In beiden Spezies liegt nahezu keine konstitutive Expression vor, jedoch ist die Expression beider Enzyme durch 3-Methylcholanthren (3-MC), 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) oder Zigarettenrauch gut induzierbar (MCLEMORE *et al.* 1990; DEY *et al.* 1999; DING und KAMINSKY 2003; CHOUDHARY *et al.* 2005). Durch Untersuchungen an *Cyp1a1-k.o.*-, *Cyp1a2-k.o.*- und Wildtyp-Mäusen wurde herausgefunden, dass mCyp1a1 eine erheblich höhere PhIP-*N*-Hydroxylierungsaktivität aufweist als mCyp1a2. Diese Aktivität ist durch TCDD-Induktion 50fach steigerbar (MA *et al.* 2006). Beim Menschen erfolgt die Umsetzung von PhIP zu *N*-Hydroxy-PhIP durch hCYP1A1 mit höherer katalytischer Effizienz als durch hCYP1A2 (CROFTS *et al.* 1998). Somit könnte in der Lunge, bei Vorliegen einer Enzyminduktion, eine effiziente *N*-Hydroxylierung von PhIP stattfinden.

HOLLNAGEL (2004) zeigte, dass die *N*-Hydroxylierungsaktivität von Ratten-Lebermikrosomen durch Vorbehandlung der Tiere mit PhIP induzierbar ist. Diese Induzierbarkeit war zwar sechsmal niedriger als bei Vorbehandlung mit Aroclor, bewirkte aber trotzdem eine Steigerung der *N*-Hydroxylierung um den Faktor 4. Falls CYP1A1 und -1A2 zu den CYP P450-Enzymen gehören, die durch PhIP induziert werden können, wäre es möglich, dass die Kapazität der Lunge, PhIP zum proximalen Mutagen zu aktivieren, bei einer längerfristigen PhIP-Exposition durch PhIP selbst erhöht werden könnte. Bei einer Kanzerogenese-Studie mit PhIP an neonatalen Mäusen wurden neben Lymphomen und Lebertumoren auch Lungentumoren gefunden (KIMURA *et al.* 2003). Somit könnte die Lunge möglicherweise ebenfalls zu den Zielorganen einer

durch PhIP verursachten Krebsentstehung gehören und eine Gefährdung des Menschen, einerseits durch die pulmonale Expression der hSULT1A1, andererseits durch eine umweltvermittelte CYP1A1- und -1A2-Induktion (Zigarettenrauch, Nahrungsbestandteile), bestehen.

4.4.2.3.2 PhIP-DNA-Addukte in der Niere

In der Niere der *hSULT1A1/1A2*-transgenen-Mäuse war die Adduktbelastung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht. Dennoch wies die Niere das niedrigste Adduktniveau unter den untersuchten Geweben der transgenen Mäuse auf. Die Überexpression des Transgens in diesem Organ, die in einem Expressionsniveau resultiert, das etwa 30% der hSULT1A1-Konzentration in der Leber der transgenen Mäuse entspricht, wirkte sich somit wenig auf die Adduktbelastung des Gewebes aus. Auch bei den Wildtyp-Mäusen gehörte die Niere zu den Geweben mit den niedrigsten Adduktbelastungen. Dies stand im Einklang mit Ergebnissen im Rattenmodell, wo nach der Leber in der Niere die niedrigste Adduktbelastung gemessen wurde (HOLLNAGEL 2004). Bei der Untersuchung der Mutagenität von PhIP in MutaTMMouse-Mäusen nach viertägiger Behandlung mit 20 mg/kg KG PhIP wurden erhöhte Mutationsfrequenzen in Dick- und Dünndarm, jedoch nicht in der Niere gemessen (LYNCH *et al.* 1996). Nach oraler Verabreichung von 100 mg/kg KG PhIP an Mäuse wurden nach 24 h 31% der Dosis mit dem Urin ausgeschieden (TURTELTAUB *et al.* 1989). Nach oraler Verabreichung von 10 mg/kg KG PhIP an Mäuse wurde gemessen, dass 15% der nach 24 h mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten unverändertes PhIP und 6% *N*-Hydroxy-PhIP darstellten (CHEN *et al.* 2007). Demnach ist die Niere den Vorläufer-Substanzen des durch SULT aktivierten Metaboliten ausgesetzt. Eine Cyp1a1- bzw. -1a2-vermittelte *N*-Hydroxylierung von PhIP in der Niere der Maus spielt vermutlich keine Rolle, da hier beide Enzyme nicht konstitutiv exprimiert werden und nur Cyp1a1 in den Glomeruli schwach induzierbar ist (DEY *et al.* 1999). Die DNA-Adduktbildung durch eine hSULT1A1/1A2- oder mSult1d1-vermittelte Aktivierung von *N*-Hydroxy-PhIP könnte in der Niere durch die hohe GST-Aktivität abgefangen werden, die in diesem Organ der Aktivität in der Leber entspricht (HOWIE *et al.* 1990).

4.4.2.3.3 PhIP-DNA-Addukte im Kolon

Das Kolon ist ein Zielorgan der PhIP-vermittelten Kanzerogenese in Ratten. Deshalb war der Einfluss der humanen SULT1A1 auf die dortige PhIP-Adduktbelastung in den transgenen Mäusen von besonderem Interesse. Diese Belastung

erwies sich als doppelt so hoch wie bei den Wildtyp-Tieren und war von ihr hochsignifikant unterschiedlich. Folglich war für das Kolon eine Auswirkung der heterologen Expression der humanen SULT1A1 auf die Adduktbelastung festzustellen.

Trotz der hohen Überexpression der hSULT1A1 im Kolon der transgenen Mäuse, mit einem gegenüber dem Menschen etwa 50fach erhöhtem Expressionsniveau, war die Adduktbelastung in diesem Gewebe niedriger als erwartet. Ein möglicher Grund dafür wäre ein fehlender Phase I-Metabolismus von PhIP in den Zellen des Kolon-epithels, verbunden mit einer niedrigen externen Zufuhr des proximalen Mutagens *N*-Hydroxy-PhIP über systemische Verteilung bzw. Resorption aus dem Darmlumen.

MA *et al.* (2006) haben nahezu keine *N*-Hydroxylierung von PhIP durch Kolon-Homogenate von Mäusen detektieren können. Auch nach Verabreichung von Cyp1a-induzierenden Substanzen konnte im Kolon der Maus keine Cyp1a2- und nur eine geringe Cyp1a1-Expression nachgewiesen werden (DEY *et al.* 1999). Die systemische Verfügbarkeit von *N*-Hydroxy-PhIP besteht jedoch, da dieser Metabolit im Urin von Mäusen detektiert werden konnte (siehe oben). Auch eine Resorption von *N*-Hydroxy-PhIP nach dessen Freisetzung aus biliär ausgeschiedenem *N*-Hydrox-PhIP-*N*3-Glucuronid durch die Aktivität mikrobieller β -Glucuronidasen wäre möglich. H. Hollnagel verglich die DNA-Adduktniveaus in Geweben keimfrei gehaltener und rekonventionalisierter Ratten und stellte in Kolon und Prostata der keimfreien Tiere signifikant niedrigere DNA-Adduktbelastungen fest (HOLLNAGEL 2004), so dass von einer Freisetzung des proximalen Mutagens auf diesem Weg ausgegangen werden kann. Es wäre daher von Interesse, zu untersuchen, wie sich das PhIP-Adduktniveau im Kolon von keimfrei gehaltenen *hSULT1A1/1A2*-transgenen und Wildtyp-Mäusen darstellt.

Eine weitere mögliche Begründung für die verhältnismäßig niedrige Adduktbelastung im Kolon der transgenen Mäuse wäre, dass die Aktivierungsreaktion und damit die Adduktbildung nicht durch eine begrenzte Substratzufuhr, sondern durch einen Mangel des Co-Faktors der SULT-vermittelten Reaktion PAPS limitiert ist. Ein solcher Mangel könnte wiederum an einer Depletion anorganischen Sulfats oder einer sehr niedrigen Expression der PAPS-synthetisierenden Enzyme PAPS-Synthase (PAPSs) 1 und/oder 2 liegen. ALNOUTI UND KLAASSEN (2006) haben die Expression von PAPSs1 und PAPSs2 auf mRNA-Ebene für verschiedene Gewebe der Maus (Stamm C57BL/6) quantifiziert und für den Dickdarm eine höhere Expression beider Enzyme als in der Leber gemessen. Somit ist eine Reaktionslimitierung durch Mangel an PAPS-Synthase im Kolon als unwahrscheinlich anzusehen.

Mutationen können nur teilungsaktive Zellen in Krebszellen umwandeln. Im Kolonepithel sind die Stammzellen und ihre direkten, noch nicht voll ausdifferenzierten Nachkommen teilungsaktiv. Bei der Untersuchung der subzellulären Verteilung der hSULT1A1/2-Expression in den transgenen Mäusen wurde eine zytosolische Expression in den differenzierten Epithelzellen der Kolonmukosa festgestellt, während die Zellen in der Kryptenmitte nur eine kernständige Expression vorwiesen und die Stammzellen am Kryptengrund die humanen Enzyme nicht exprimierten. Auch in den humanen Enterozyten war eine ausschließlich kernständige SULT1A1/2-Expression in der Kryptenmitte nachgewiesen worden (TEUBNER *et al.* 2007). In der Kryptenmitte könnten Zellen mit noch nicht terminaler Differenzierung vorliegen, bei denen Mutationen zu unkontrollierter Teilung führen könnten. Wäre es dem proximalen Mutagen *N*-Hydroxy-PhIP möglich, in den Zellkern zu gelangen, so könnte eine SULT-vermittelte Aktivierung in direkter Nachbarschaft zur DNA stattfinden, die eine hohe DNA-Adduktbelastung hervorrufen sollte. Es wäre daher von Interesse, zu untersuchen, ob *N*-Hydroxy-PhIP in der Lage ist, in den Kern einer Zelle zu gelangen.

In Untersuchungen zur Persistenz von PhIP-DNA-Addukten im Kolon und weiteren Abschnitten des Gastrointestinaltrakts sowie in Leber und Lunge haben CUMMINGS UND SCHUT (1994) in all diesen Geweben ähnliche Raten der Adduktentfernung gefunden. Allerdings zeigte eine Untersuchung des Zellumsatzes in den angeführten Geweben, dass dieser an den Tagen 1 und 2 nach PhIP-Applikation im Intestinaltrakt mehr als 30fach höher lag als in Leber und Lunge. Daraus schlossen die Autoren, dass die PhIP-DNA-Adduktentfernung im Darm hauptsächlich über einen erhöhten Zellumsatz und nicht über Reparaturmechanismen vonstatten geht. Eine erhöhte Zellteilungsrate von Zellen, deren DNA Adduktschäden trägt, könnte zu erhöhten Mutationsraten und infolgedessen zu Krebsentstehung führen. Möglicherweise trägt dieser Modus der Adduktentfernung dazu bei, das Kolon zu einem Zielgewebe einer PhIP-vermittelten Kanzerogenese werden zu lassen.

4.4.2.3.4 PhIP-DNA-Addukte in Jejunum, Ileum und Caecum

Die Wildtyp-Mäuse wiesen in dieser Arbeit die höchsten Adduktniveaus in Jejunum, Ileum und Caecum auf. Die Adduktbelastung war in diesen Darmabschnitten etwa doppelt so hoch wie im Kolon. Bei Ratten hingegen wurden die höchsten Adduktbelastungen des Intestinaltrakts im Kolon detektiert (CUMMINGS und SCHUT 1994; HOLLNAGEL 2004). Somit korreliert das intestinale Adduktniveau in diesen Spezies mit

deren jeweiligem Zielgewebe einer PhIP-vermittelten Krebsentstehung: dem Kolon bei der Ratte und dem Dünndarm bei der Maus (ITO *et al.* 1991; OCHIAI *et al.* 2002).

Bei den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen wurde trotz der starken Expression der humanen Enzyme in diesen Geweben im Vergleich zum Wildtyp keine Erhöhung der Adduktbelastung festgestellt. Zwar war der im Ileum der transgenen Mäuse gemessene Adduktwert höher als der bei den Wildtyp-Mäusen, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Jejunum und Ileum sind die Darmabschnitte, in denen die Absorption der Nährstoffe aus der Nahrung und somit auch die Absorption in der Nahrung enthaltener Xenobiotika erfolgt. Folglich wird bei oraler Applikation jedes PhIP-Molekül, das Leber oder systemischen Kreislauf der Mäuse erreicht, als erstes von einer Epithelzelle des Dünndarms aufgenommen. Daher ist dieses Gewebe einer hohen PhIP-Belastung ausgesetzt. Allerdings weisen Dünndarmmikrosomen bzw. Dünndarmhomogenate von Mäusen keine PhIP-*N*-Hydroxylierungsaktivität auf (BROOKS *et al.* 1994; MA *et al.* 2006). Somit kann nur *N*-Hydroxy-PhIP, das systemisch gebildet und sekundär in die Dünndarmzellen gelangt, als Substrat einer Phase II-Aktivierung in den Dünndarmzellen dienen.

Falls eine solche Phase II-Aktivierung erfolgt, muss - aufgrund des fehlenden Unterschieds im Adduktniveau zwischen Transgenen und Wildtypen in Jejunum und Ileum - der Ablauf der Aktivierungsreaktion in irgendeiner Weise limitiert sein. Die Expression der PAPSs1 und PAPSs2 erfolgte in Jejunum und Ileum in ähnlicher Stärke wie in der Leber (ALNOUTI und KLAASSEN 2006), so dass ein Mangel an Co-Substrat für eine Sulfotransferase-vermittelte Aktivierung keinen Limitierungsfaktor darstellen sollte. Es wäre möglich, dass die Exposition der Dünndarmzellen gegenüber *N*-Hydroxy-PhIP verhältnismäßig niedrig ist, so dass das Expressionsniveau an Phase II-metabolisierenden Enzymen mit *N*-Hydroxy-PhIP-Aktivierungskapazität in den Zellen der Wildtyp-Mäuse ausreicht, um diesen Metaboliten quantitativ zu aktivieren. Auch könnte durch die starke *hSULT1A1/2*-vermittelte Aktivierung in Leber und Lunge der transgenen Mäuse bereits viel des proximalen Mutagens in diesen Geweben abgefangen worden sein. Dadurch könnte bei ihnen deutlich weniger *N*-Hydroxy-PhIP systemisch zur Verfügung stehen als bei den Wildtyp-Mäusen. Somit würden die ähnlichen Adduktniveaus in Jejunum, Ileum und Caecum der transgenen und Wildtyp-Mäuse nicht ein ähnliches Phase II-Aktivierungspotential, sondern einen ausgeprägten Unterschied in der Exposition gegenüber dem proximalen Mutagen reflektieren.

Von den murinen Sult-Formen wurden mSult1a1 und mSult1d1 hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von *N*-Hydroxy-PhIP im Ames-Test untersucht. Die murine Sult1a1 setzte *N*-Hydroxy-PhIP nicht zum Mutagen um, während mSult1d1 eine deutliche Aktivierungskapazität gegenüber *N*-Hydroxy-PhIP aufwies, die allerdings niedriger war als die der humanen SULT1A1 (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Die murine Sult1d1 wird im Intestinaltrakt der Maus stark exprimiert (ALNOUTI und KLAASSEN 2006), (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Demnach könnte die mSult1d1-vermittelte Aktivierung des *N*-Hydroxy-PhIP die Adduktbelastung im Dünndarm der Wildtyp-Mäuse bewirken. Da bereits eine für die murine Sult1d1 defiziente Mauslinie erstellt wurde, die in Kürze für toxikologische Experimente zur Verfügung stehen wird, kann der Einfluss dieses Enzyms auf die PhIP-DNA-Adduktbildung in Mäusen in naher Zukunft untersucht werden.

Zwar sind die humanen NAT1 und NAT2 nicht in der Lage, *N*-Hydroxy-PhIP effizient zum ultimalen Mutagen umsetzen (MUCKEL *et al.* 2002), doch es ist nicht geklärt, ob dies auch für die murinen NAT zutrifft. Laut WARE *et al.* (1996) ist die Proteinexpression dieser Enzyme bei der Maus, im Gegensatz zur Ratte, nicht gleichmäßig über den Gastrointestinaltrakt verteilt. Sie fanden die höchste NAT2-Expression im Caecum, während NAT1 am höchsten im proximalen Dünndarm exprimiert wurde. STANLEY *et al.* (1997) wiesen eine Expression der murinen NAT2 in Hepatozyten und in Epithelzellen von vielen Organen, u.a. Dünndarm, Niere und Lunge, nach. Bei der Inkubation von *N*-Hydroxy-PhIP mit DNA und Leber-Zytosol von Mäusen wurde sowohl bei PAPS- als auch bei Acetyl-CoA-Zugabe ein Anstieg der DNA-Adduktbildung gemessen (BUONARATI *et al.* 1990). Allerdings hat im Ames-Test mit *N*-Hydroxy-PhIP die Zugabe von PAPS, nicht jedoch von Acetyl-CoA, zu mit Zytosol angereicherten Mikrosomenpräparationen aus Mäuselebern einen Anstieg der Mutagenität bewirkt (BUONARATI und FELTON 1990). Zum besseren Verständnis der mit den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäusen erzielten Ergebnisse sollten daher die murinen NAT hinsichtlich ihres Vermögens, *N*-Hydroxy-PhIP zu aktivieren, genauer untersucht werden.

Ein alternativer Erklärungsansatz für gleiche Adduktniveaus in Jejunum, Ileum und Caecum der transgenen und Wildtyp-Mäuse wäre die dortige Aktivierung von PhIP durch ein anderes enzymatisches System. Moonen *et al.* beschreiben die PhIP-Aktivierung durch eine COX-katalysierte Ein-Elektronen-Oxidation unter Erzeugung eines PhIP-Radikals (MOONEN *et al.* 2002). Sie zeigten, dass PhIP einen inhibierenden Effekt auf die COX-vermittelte Bildung von Hydroxylradikalen bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine hatte. Der Nachweis der Bildung von PhIP-Radika-

len wurde indirekt durch Nachweis von Glutathion-abgeleiteten Thiyl-Radikalen bei der COX-vermittelten PhIP-Aktivierung erbracht, die bei der S9-Mix-vermittelten Aktivierung nicht auftraten. Für S9- und für COX-vermittelte PhIP-Aktivierung wurde im ^{32}P -Postlabelling das gleiche Adduktmuster nachgewiesen (MOONEN *et al.* 2002). In einer humanen Kolonadenokarzinom-Zelllinie mit hoher COX-2-Expression konnte die DNA-Adduktbildung durch PhIP mittels CYP1A2-Inhibition auf 40%, durch COX-Inhibition auf 30% und bei Kombination beider Hemmstoffe auf 20% des Kontrollwerts reduziert werden (MOONEN *et al.* 2004). Beim Menschen wird das Enzym COX-1 in nahezu jedem extrahepatischen Gewebe konstitutiv exprimiert, während die Expression von COX-2 in vielen Geweben induziert werden kann (WIESE *et al.* 2001). Wäre der COX-vermittelte Aktivierungsweg im Dünndarm relevant, so könnten die dortigen Addukte direkt aus absorbiertem PhIP entstehen. Dadurch könnten die Dünndarmzellen eine Barriere gegenüber einer hohen systemischen PhIP-Exposition darstellen.

4.4.2.4 DNA-Addukte als Hinweis auf gewebespezifische Kanzerogenität?

Verglichen mit der Situation im Menschen weisen die im PhIP-Versuch eingesetzten *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse ein stark erhöhtes Expressionsniveau der humanen Enzyme auf. In diesen Mäusen konnte erstmals untersucht werden, ob die Expression der *hSULT1A1/1A2* *in vivo* überhaupt eine Auswirkung auf DNA-Adduktbildung durch PhIP hat und welche Gewebe insbesondere von einer Adduktbildung betroffen sind. Um in weiteren Tierversuchen die Situation im Menschen genauer abbilden zu können, sollte eine der transgenen Mauslinien eingesetzt werden, die ein niedrigeres, eher humanrelevantes *hSULT1A1/1A2*-Expressionsniveau aufweist.

Eine weitere Problematik bei der Übertragung der in den *hSULT1A1/1A2*-transgenen Mäuse erzielten Ergebnisse auf die Situation im Menschen liegt darin, dass die Aktivierung von PhIP über die CYP-vermittelte Bildung des proximalen Mutagens *N*-Hydroxy-PhIP verläuft. Dieser Prae-Aktivierungsschritt ist im verwendeten Modell nicht humanisiert. Da die *N*-Hydroxylierung der exozyklischen Aminogruppe durch *hCYP1A2* die vorrangige Oxidationsreaktion beim Menschen ist, während beim Nager die zur Detoxifizierung führende Hydroxylierung der Phenylgruppe vorherrscht (Abschnitt 4.4.2), könnte das Ausmaß einer *hSULT1A1/2*-vermittelten Aktivierung im verwendeten Modell sogar unterschätzt werden. Eine Möglichkeit wäre, die für *hCYP1A1* und *hCYP1A2* humanisierten Mauslinien von Cheung *et al.* mit dem in dieser Arbeit erzeugten Mausmodell zu kombinieren (CHEUNG *et al.* 2005a). In einer solchen, dop-

pelt humanisierten Mauslinie wäre der gesamte Toxifizierungsweg von PhIP der Situation im Menschen entsprechend abgebildet.

Ob ein hohes PhIP-Adduktniveau in einem Gewebe einen Hinweis auf eine mögliche Krebsentstehung in diesem Gewebe darstellt, muss in Langzeit-Kanzerogenese-Studien überprüft werden. OCHIAI *et al.* (2002) haben gezeigt, dass PhIP in C57BL/6N-Mäusen Dünndarntumoren auslöst, während PhIP in Mäusen des Stammes CDF1 ausschließlich Lymphome induziert (ESUMI *et al.* 1989). In dieser Arbeit bewirkte PhIP bei den Wildtyp-Mäusen des Stammes FVB/N das höchste gemessene Adduktniveau – doppelt so hoch wie im Kolon – im Dünndarm, während Ratten, bei denen PhIP unter anderem Kolontumoren induzierte (ITO *et al.* 1991), im Kolon doppelt so hohe PhIP-Adduktniveaus wie im Dünndarm vorwies (HOLLNAGEL 2004). Folglich lässt sich ein Zusammenhang zwischen Adduktniveau und Zielgewebe der Krebsentstehung vermuten. Durch eine vergleichende Untersuchung der Adduktniveaus nach PhIP-Applikation im Dünndarm der drei oben genannten Mausstämmen könnte möglicherweise ein weiterer Hinweis auf eine Korrelation zwischen PhIP-Adduktniveau und Krebsentstehung in diesem Gewebe erhalten werden.

PhIP unterscheidet sich von den anderen HAA dadurch, dass es weder in der Ratte noch in der Maus Lebertumoren induziert (SUGIMURA *et al.* 2004). Eine mögliche Ursache für die Gewebespezifität der PhIP-vermittelten Tumorentwicklung könnte dessen östrogene Wirkung sein. Gooderham *et al.* zeigten, dass PhIP in dosisabhängiger Weise den Östrogenrezeptor ER α aktiviert und in der Lage ist, in der östrogenabhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 im gleichen Umfang wie 17 β -Östradiol eine Zellproliferation zu bewirken (GOODERHAM *et al.* 2002). Somit könnten ER α -exprimierende Zellen, die eine durch PhIP-DNA-Addukte erzeugte initiale genotoxische Läsion tragen, durch den östrogenen Stimulus von PhIP zur Proliferation angeregt werden und die dadurch bewirkte Expansion der geschädigten Zellen zur Entstehung von Tumoren führen. CRETON *et al.* (2007) konnten zeigen, dass nahrungsrelevante PhIP-Dosen Signalwege anstoßen können, die neben einer Proliferation auch eine Zellmigration bewirken. Folglich ist PhIP einerseits in der Lage, durch DNA-Adduktierung Schäden am Genom zu verursachen und kann andererseits in bestimmten, dafür empfänglichen Geweben dazu beitragen, Schäden dieser Art zu fixieren und zu expandieren. Anbetrachts der regelmäßigen – oft täglichen – PhIP-Aufnahme durch den Menschen, die zu einer zwar niedrigen, aber dauerhaften Exposition führt, und der hohen Tumorzinzidenz des Menschen in Geweben, die Zielgewebe einer PhIP-vermittelten Tumorentstehung in der Ratte darstellen, ist es notwendig, weitere Anstrengungen zu unter-

nehmen, um die Mechanismen einer möglichen gewebespezifischen Tumorentwicklung durch PhIP aufzuklären.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Die Enzyme der Sulfotransferase-Gensuperfamilie (SULT) konjugieren nukleophile Gruppen von kleinen endogenen Verbindungen und Fremdstoffen mit der negativ geladenen Sulfo-Gruppe. Dadurch wird die Polarität dieser Verbindungen erhöht, ihre passive Permeation von Zellmembranen verhindert und somit ihre Ausscheidung erleichtert. Von den resultierenden Sulfat-, Sulfamat- oder Thiosulfat-Gruppen stellen insbesondere die Sulfatgruppen aufgrund ihres elektronenziehenden Charakters in bestimmten chemischen Verbindungen gute Abgangsgruppen dar. Durch spontane Abspaltung entstandene Carbenium- oder Nitreniumionen können mit DNA oder anderen zellulären Nucleophilen reagieren. In Testsystemen für Mutagenität wurde eine große Zahl von Verbindungen, zu denen Nahrungsinhaltsstoffe und Umweltkontaminanten gehören, durch SULT zu Mutagenen aktiviert. Dabei zeigte sich eine ausgeprägte Substratspezifität auch orthologer SULT-Formen unterschiedlicher Spezies. Auch in der Gewebeverteilung der SULT liegen große Interspezies-Unterschiede vor. Die Leber ist das Organ, in dem bei Nagern die meisten SULT exprimiert werden, während beim Menschen eine Expression vieler SULT-Formen auch in extrahepatischen Geweben erfolgt. Somit könnten sich die Zielgewebe einer SULT-induzierten Krebsentstehung bei Mensch und Nager unterscheiden.

Um die Beteiligung von humanen SULT an der Bioaktivierung von Fremdstoffen im Tiermodell untersuchen zu können, wurden transgene Mauslinien für den Cluster der humanen *SULT1A1*- und *-1A2*-Gene sowie für *SULT1B1* generiert. *SULT1A1* und *SULT1A2* wurden aufgrund ihrer geringen Distanz im Humangenom gemeinsam in eine Mauslinie überführt. Zur Herstellung der transgenen Linien wurden große DNA-Konstrukte verwendet, die die *SULT*-Gene inklusive langer flankierender Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts der Gene enthielten. Die mit in das Mausgenom überführten flankierenden Bereiche sollten eine der Humansituation entsprechende Gewebeverteilung der Proteinexpression bewirken. Außerdem sollte der Einfluss der umgebenden Genomsequenz der Maus auf die Expression der Transgene minimiert werden. Es wurden je drei transgene Linien – die Linien 7, 633 und 714 – für *hSULT1A1/1A2* und drei transgene Linien – die Linien 5, 12 und 275 – für *hSULT1B1*

etabliert. Die Expression der humanen Proteine konnte in allen Linien gezeigt werden und bis auf Linie 633 konnten alle Linien homozygot bezüglich der Transgene gezüchtet werden. Die Tiere der homozygoten Linien und die hemizygoten Tiere der Linie 633 waren von unauffälligem Phänotyp. In der molekularbiologischen Charakterisierung der transgenen Linien wurde der chromosomale Integrationsort der Konstrukte bestimmt und die Kopienzahl pro Genom untersucht. Mit Ausnahme der Linie 714, bei der Kopien des Konstrukts in zwei unterschiedliche Chromosomen integriert vorliegen, wiesen alle Linien nur einen Transgen-Integrationsort auf. Die Untersuchung der Transgen-Kopienzahl ergab, dass die Mauslinien zwischen einer und etwa 20 Kopien des Transgen-Konstrukts pro Genom trugen. In der proteinbiochemischen Charakterisierung der Mauslinien wurde gezeigt, dass die transgenen Mauslinien die humanen Proteine mit einer weitgehend der des Menschen entsprechenden Gewebeverteilung exprimieren. Die Intensität der im Immunblot nachgewiesenen Proteine korrelierte mit der Kopienzahl der Transgene. Die zelluläre und subzelluläre Verteilung der Transgen-Expression wurden bei der *hSULT1A1/1A2*-transgenen Linie 7 in Leber, Niere, Lunge, Pankreas, Dünndarm und Kolon und bei der *hSULT1B1*-transgenen Linie 12 im Kolon untersucht. Sie stimmte ebenfalls mit der Verteilung der entsprechenden SULT-Formen im Menschen überein. Für Linie 7 konnte gezeigt werden, dass die heterolog exprimierten humanen Proteine enzymatische Aktivität hinsichtlich eines typischen Substrats der hSULT1A1 und hSULT1A2 aufwiesen.

Da sich die erzeugten transgenen Linien aufgrund ihrer mit dem Menschen vergleichbaren Gewebeverteilung der SULT-Expression als Modellsystem zur Untersuchung der menschlichen SULT-vermittelten metabolischen Aktivierung eigneten, wurde eine der erzeugten transgenen Linien – die *hSULT1A1/1A2*-transgene Linie 7 – für zwei erste toxikologische Untersuchungen eingesetzt. Den Mäusen wurden chemische Verbindungen verabreicht, für die in *in vitro*-Versuchen eine hSULT1A1/1A2-vermittelte Bioaktivierung zu Mutagenen gezeigt worden war. In beiden Untersuchungen wurde die Gewebeverteilung der entstandenen DNA-Addukte als Endpunkt einer gewebe-spezifischen genotoxischen Wirkung ermittelt. In der ersten Untersuchung wurden 90 mg/kg Körpergewicht 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin – ein in gebratenem Fleisch gebildetes heterozyklisches aromatisches Amin – transgenen sowie Wildtyp-Mäusen oral verabreicht. Acht Stunden nach Applikation wiesen die transgenen Mäuse signifikant höhere Addukt-niveaus als die Wildtyp-Mäuse in Leber, Lunge, Niere, Milz und Kolon auf. In der Leber der transgen Mäuse war das Addukt-niveau 17fach höher als in der Leber der Wildtyp-Mäuse. Darüber hinaus war bei den

transgenen Tieren die Leber das Organ mit dem höchsten DNA-Adduktniveau, wo hingegen bei den Wildtyp-Tieren in der Leber die geringste Menge an DNA-Addukten nachzuweisen war. In der zweiten Untersuchung (eine Pilotstudie mit geringer Tierzahl) wurde transgenen und Wildtyp-Mäusen 19 mg/kg Körpergewicht des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs 1-Hydroxymethylpyren – ein Metabolit der Nahrungs- und Umweltkontaminante 1-Methylpyren – intraperitoneal verabreicht. Nach 30 Minuten wurden, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen, bis zu 25fach erhöhte Adduktniveaus bei den transgenen Mäusen in Leber, Niere, Lunge und Jejunum nachgewiesen. Somit konnte anhand einer in dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinie erstmals gezeigt werden, dass die Expression der humanen *SULT1A1/1A2* tatsächlich sowohl auf die Stärke als auch die Zielgewebe der DNA-Adduktbildung *in vivo* eine Auswirkung hat.

5.2 Summary

The enzymes of the sulfotransferase gene superfamily (SULT) conjugate nucleophilic groups of small endogenous compounds and xenobiotics with the negatively charged sulfo group. Thus, the polarity of the compounds is increased, their passive permeation of cell membranes is hindered and their excretion facilitated. Of the resulting sulfate, sulfamate or thiosulfate groups, it is especially the sulfate groups that form good leaving groups in certain chemical linkages due to their electron-withdrawing characteristics. Carbenium or nitrenium ions resulting from a spontaneous cleavage may react with DNA and other cellular nucleophiles. In test systems for mutagenicity, a large amount of compounds including ingredients of nutrition and environmental contaminants were activated to mutagens by SULT. Thereby, a pronounced substrate specificity even of orthologous SULT forms of different species was evidenced. Also, the tissue distribution of SULT exhibited pronounced interspecies differences. The liver is the organ in which rodents express most SULT whereas in humans the expression of many SULT forms also occurs in extrahepatic tissues. Thus, the target tissues of a SULT induced carcinogenesis could differ across humans and rodents.

To investigate the involvement of human SULT in the bioactivation of xenobiotics in an animal model, transgenic mouse lines for the human *SULT1A1*- and *-1A2* gene cluster as well as for *SULT1B1* were generated. Due to their small distance in the human genome, *SULT1A1* and *SULT1A2* were transferred together into one mouse line. For the construction of the transgenic lines, large genomic constructs were used

containing the SULT genes and long flanking sequences up- and downstream of the genes. The co-transferred flanking regions should cause a tissue distribution of protein expression corresponding to the situation in humans. Moreover, the influence of the surrounding murine genome sequence on the transgene expression should be minimized. Three transgenic lines – lines 7, 633 and 714 – for *hSULT1A1/1A2* and three transgenic lines – lines 5, 12 and 275 – for *SULT1B1* were established. The expression of the human proteins could be shown for all lines and except for line 633 all lines could be bred to homozygosity regarding the transgene. The homozygous animals and the hemizygous animals of line 633 were of an inconspicuous phenotype. By molecular biological characterization of the transgenic lines the chromosomal integration locus of the constructs was identified and the copy number per genome was investigated. With the exception of line 714, where the construct is integrated into two different chromosomes, all lines exhibited just one transgene integration locus. By investigating the transgene copy number it was deduced that the mouse lines carry between one and 20 copies of the transgene construct per genome. The protein biochemical characterization showed that the transgenic mouse lines express the human proteins with a tissue distribution largely similar to the one in humans. The intensity of the proteins detected by immunoblotting correlated with the copy number of the transgenes. The cellular and subcellular distribution of the transgene expression was investigated for the *hSULT1A1/1A2* transgenic line 7 in liver, kidney, lung, pancreas, small intestine and colon and for the *hSULT1B1* transgenic line 12 in colon. It also accorded with the distribution of the respective SULT in humans. For line 7, it could be demonstrated that the heterologously expressed human proteins exhibit enzymatic activity towards a typical substrate of hSULT1A1 and hSULT1A2.

Owing to this similarity of the transgene expression to the corresponding human tissue distribution, the transgenic lines were considered suitable as model systems for the investigation of the human SULT mediated metabolic activation. One of the transgenic lines – the *hSULT1A1/1A2* transgenic line 7 – was used in two first toxicological investigations. Chemical compounds for which *in vitro* experiments demonstrated a hSULT1A1/1A2 mediated bioactivation were administered to the mice. In both investigations the tissue distribution of the resulting DNA adducts was determined as an end point for a tissue-specific genotoxic effect. In a first investigation, 90 mg/kg bodyweight of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine – a heterocyclic amine formed in cooked meat – was orally administered to transgenic and wild type mice. Eight hours after application, the transgenic mice exhibited significantly higher adduct levels than

the wild type controls in liver, lung, kidney, spleen and colon. The adduct level in the liver of the transgenic mice exceeded that in the wild type liver by a factor of 17. Furthermore, the liver was the organ with the highest adduct level in the transgenic animals and with the lowest adduct level in the wild type animals. In a second investigation (a pilot study with few animals) 19 mg/kg bodyweight of the polycyclic aromatic hydrocarbon 1-hydroxymethylpyrene – a metabolite of the nutritional and environmental contaminant 1-methylpyrene – were intraperitoneally administered to transgenic and wild type mice. After 30 minutes, up to 25 fold higher adduct levels were detected in liver, kidney, lung and jejunum of the transgenic mice compared to the wild type. Thus, with a transgenic mouse line generated in this thesis, it could be shown for the first time that the expression of human SULT1A1/1A2 has in fact an impact on the strength as well as on the target tissue of the generation of DNA-adducts *in vivo*.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 01: In den Phasen I und II des Fremdstoffmetabolismus wird die auszuscheidende Substanz von einer lipophilen (A) in eine hydrophile (B) Form überführt, die vom Organismus renal oder biliär eliminiert werden kann.....	3
Abb. 02: Grundzüge des PhIP-Metabolismus in Säugetieren.	6
Abb. 03: SULT-vermittelte Bioaktivierung von 1-Hydroxymethylpyren (1-HMP).	9
Abb. 04: Pronukleus-Injektion als Technik zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie.	14
Abb. 05: Sall-Verdau und Religation des PAC-Konstrukts Nr.1 (PAC1).....	39
Abb. 06: Das zur Herstellung der hSULT1B1-transgenen Linien eingesetzte PAC-Vektorkonstrukt.	41
Abb. 07: PCR-Experimente zur Genotypisierung der hSULT1A1/1A2-transgenen Mauslinien.....	42
Abb. 08: PCR-Experimente zur Genotypisierung der hSULT1B1-transgenen Mauslinien.....	43
Abb. 09: Unterscheidung zwischen homo- und hemizygoten Nachkommen der hSULT1A1/1A2-transgenen Linie 7 mittels Echtzeit-PCR.	44
Abb. 10: Spectral Karyotyping (SKY) (links) und Einfarb-FISH (rechts) zum Nachweis des Transgens.....	47
Abb. 11: Schematische Darstellung der Methode zum Nachweis des Integrationsortes des hSULT1B1-Transgen-Konstrukts (Genome Walking).....	51
Abb. 12: Ergebnisse des Genome Walking für die hSULT1B1-transgene Linie 275.....	52
Abb. 13: Ergebnisse des Genome Walking für die hSULT1A1/1A2-transgene Linie 633.	54
Abb. 14: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen einer transgenen Maus der Linie 7.....	56
Abb. 15: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 7 und Vergleich mit der Immundetektion in Zytosolpräparationen humaner Gewebe.	57
Abb. 16: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 714.	58
Abb. 17: Immundetektion von hSULT1A1 und hSULT1A2 in Zytosolpräparationen der Gewebe einer hemizygot transgenen Maus der Linie 633.	58
Abb. 18: Immundetektion von hSULT1A1 in Zytosolpräparationen von Kolon und Leber hemizygot transgener Mäuse der Linien 7, 633 und 714 zum Vergleich der Expressionsstärke in den drei Linien.....	59

Abb. 19: Immundetektion von hSULT1B1 in zytosolischen Fraktionen verschiedener Gewebe hemizygot transgener Mäuse der Linien 12, 275 und 5.....	60
Abb. 20: Vergleich der hSULT1B1-Expressionsstärke im Kolon einer hemizygot transgenen Maus der Linie 12 mit einer humanen Probe.....	61
Abb. 21: Vergleich der Expressionsstärke der hSULT1B1 im Kolon und in der Leber der hemizygoter Mäuse der transgenen Linien 12, 275 und 5.	62
Abb. 22: Nachweis der hSULT1A1 in der Leber einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D).	64
Abb. 23: Nachweis der hSULT1A1 in der Niere einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D).	64
Abb. 24: Nachweis der hSULT1A1 in der Lunge einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D).....	65
Abb. 25: Nachweis der hSULT1A1 im Pankreas einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D).....	65
Abb. 26: Nachweis der hSULT1A1 im Jejunum einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle (D).	66
Abb. 27: Nachweis der hSULT1A1 im Kolon einer Maus der transgenen Linie 7 (B und C) und Vergleich mit einer nicht-transgenen Kontrolle.	66
Abb. 28 Vergleich der Lokalisation der hSULT1A1-Expression im Kolon einer Maus der transgenen Linie 7 (B) und im humanen Kolon (C) sowie Vergleich mit einer nicht-transgenen Maus (A).....	67
Abb. 29 Vergleich der Lokalisation der hSULT1B1-Expression im Kolon einer Maus der transgenen Linie 12 (B) und im humanen Kolon (C) sowie Vergleich mit einer nicht-transgenen Maus (A).....	67
Abb. 30: Enzymatische SULT1A1/1A2-Aktivität in Leber- und Kolonzytosolen von drei hSULT1A1/1A2-transgenen Mäusen der Linie 7 (TG) und von einer Wildtyp-Maus.....	68
Abb. 31: ³² P-Postlabelling-Chromatogramme	70
Abb. 32: Vergleich der DNA-Adduktniveaus der Kolonmukosa zwischen hSULT1A1/1A2-transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen 24 h nach Behandlung mit 90 mg/kg KG PhIP und Vergleich mit Vehikel-Kontrollen mittels ³² P-Postlabelling.....	71
Abb. 33: Vergleich der DNA-Adduktniveaus der Kolonmukosa und der Leber zwischen hSULT1A1/1A2-transgenen und Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit 90 mg/kg KG PhIP zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation.....	72
Abb. 34: PhIP-DNA-Adduktniveaus in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts sowie in Leber, Lunge, Niere und Milz männlicher hSULT1A1/1A2-transgener und Wildtyp-Mäuse.	73
Abb. 35: ³² P-Postlabelling-Chromatogramme.....	75

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Verfügung stehende PAC-Vektoren, die humanen SULT1A1/1A2 enthaltend.	39
Tabelle 2: PAC-Vektor, die humanen SULT1B1 enthaltend.....	40
Tabelle 3: Mittels SKY identifizierte chromosomale Integrationsorte der Transgen-Konstrukte in den sechs transgenen Linien.....	48
Tabelle 4: Verhältnisse der relativen Transgen-Kopienzahlen der sechs transgenen Linien..	49
Tabelle 5: Einzeldaten und Mittelwerte der 1-SMP-DNA-Addukte als Addukte pro 10^8 Nukleotide in verschiedenen Geweben von hSULT1A1/1A2-transgenen und Wildtyp-Mäusen 0,5 und 3 h nach der Applikation von 1-HMP.....	77

8 Literaturverzeichnis

- AKSOY, I. A., D. F. CALLEN, S. APOSTOLOU, C. HER und R. M. WEINSHILBOUM (1994). "Thermolabile phenol sulfotransferase gene (STM): localization to human chromosome 16p11.2." *Genomics* **23**(1): 275-277.
- AKSOY, I. A. und R. M. WEINSHILBOUM (1995). "Human thermolabile phenol sulfotransferase gene (STM): molecular cloning and structural characterization." *Biochem Biophys Res Commun* **208**(2): 786-795.
- ALNOUTI, Y. und C. D. KLAASSEN (2006). "Tissue distribution and ontogeny of sulfotransferase enzymes in mice." *Toxicol Sci* **93**(2): 242-255.
- ANDERSON, R. J., L. L. BABBITT und D. K. LIEBENTRITT (1995). "Human liver triiodothyronine sulfotransferase: copurification with phenol sulfotransferases." *Thyroid* **5**(1): 61-66.
- AUGUSTSSON, K., K. SKOG, M. JAGERSTAD, P. W. DICKMAN und G. STEINECK (1999). "Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study." *Lancet* **353**(9154): 703-707.
- BADER, M., H. BOHNEMEIER, F. S. ZOLLMANN, O. E. LOCKLEY-JONES und D. GANTEN (2000). "Transgenic animals in cardiovascular disease research." *Exp Physiol* **85**(6): 713-731.
- BERNIER, F., G. LEBLANC, F. LABRIE und V. LUU-THE (1994). "Structure of human estrogen and aryl sulfotransferase gene. Two mRNA species issued from a single gene." *J Biol Chem* **269**(45): 28200-28205.
- BERNIER, F., P. SOUCY und V. LUU-THE (1996). "Human phenol sulfotransferase gene contains two alternative promoters: Structure and expression of the gene." *DNA Cell Biol* **15**(5): 367-375.
- BLANCHARD, R. L., R. R. FREIMUTH, J. BUCK, R. M. WEINSHILBOUM und M. W. COUGHTRIE (2004). "A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily." *Pharmacogenetics* **14**(3): 199-211.
- BONASSI, S., F. MERLO, N. PEARCE und R. PUNTONI (1989). "Bladder cancer and occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." *Int J Cancer* **44**(4): 648-651.
- BOOBIS, A. R., A. M. LYNCH, S. MURRAY, R. DE LA TORRE, A. SOLANS, M. FARRE, J. SEGURA, N. J. GOODERHAM und D. S. DAVIES (1994). "CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans." *Cancer Res* **54**(1): 89-94.
- BOOBIS, A. R., N. J. GOODERHAM, K. J. RICH, K. ZHAO, R. J. EDWARDS, B. P. MURRAY, A. M. LYNCH, S. MURRAY und D. S. DAVIES (1995). "Enzymatic studies of the activation of heterocyclic food mutagens in man." *Princess Takamatsu Symp* **23**: 134-144.
- BRADLEY, M. E. und S. A. BENNER (2005). "Phylogenomic approaches to common problems encountered in the analysis of low copy repeats: the sulfotransferase 1A gene family example." *BMC Evol Biol* **5**(1): 22.
- BROOKS, R. A., N. J. GOODERHAM, K. C. ZHAO, R. J. EDWARDS, L. A. HOWARD, A. R. BOOBIS und D. J. WINTON (1994). "2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine is a potent mutagen in the mouse small intestine." *Cancer Res* **54**(7): 1665-1671.

- BUONARATI, M. H. und J. S. FELTON (1990). "Activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) to mutagenic metabolites." *Carcinogenesis* **11**(7): 1133-1138.
- BUONARATI, M. H., M. ROPER, C. J. MORRIS, J. A. HAPPE, M. G. KNIZE und J. S. FELTON (1992). "Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in mice." *Carcinogenesis* **13**(4): 621-627.
- BUONARATI, M. H., K. W. TURTELTaub, N. H. SHEN und J. S. FELTON (1990). "Role of sulfation and acetylation in the activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine to intermediates which bind DNA." *Mutat Res* **245**(3): 185-190.
- BUTLER, L. M., R. SINHA, R. C. MILLIKAN, C. F. MARTIN, B. NEWMAN, M. D. GAMMON, A. S. AMMERMAN und R. S. SANDLER (2003). "Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study." *Am J Epidemiol* **157**(5): 434-445.
- CHEN, C., X. MA, M. A. MALFATTI, K. W. KRAUSZ, S. KIMURA, J. S. FELTON, J. R. IDLE und F. J. GONZALEZ (2007). "A comprehensive investigation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) metabolism in the mouse using a multivariate data analysis approach." *Chem Res Toxicol* **20**(3): 531-542.
- CHEUNG, C., X. MA, K. W. KRAUSZ, S. KIMURA, L. FEIGENBAUM, T. P. DALTON, D. W. NEBERT, J. R. IDLE und F. J. GONZALEZ (2005a). "Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in mice humanized for CYP1A1 and CYP1A2." *Chem Res Toxicol* **18**(9): 1471-1478.
- CHEUNG, C., A. M. YU, J. M. WARD, K. W. KRAUSZ, T. E. AKIYAMA, L. FEIGENBAUM und F. J. GONZALEZ (2005b). "The cyp2e1-humanized transgenic mouse: role of cyp2e1 in acetaminophen hepatotoxicity." *Drug Metab Dispos* **33**(3): 449-457.
- CHOUDHARY, D., I. JANSSON, I. STOILOV, M. SARFARAZI und J. B. SCHENKMAN (2005). "Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues." *Arch Biochem Biophys* **436**(1): 50-61.
- COLES, B., S. A. NOWELL, S. L. MACLEOD, C. SWEENEY, N. P. LANG und F. F. KADLUBAR (2001). "The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk." *Mutat Res* **482**(1-2): 3-10.
- CORCHERO, J., C. P. GRANVIL, T. E. AKIYAMA, G. P. HAYHURST, S. PIMPRALE, L. FEIGENBAUM, J. R. IDLE und F. J. GONZALEZ (2001). "The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse." *Mol Pharmacol* **60**(6): 1260-1267.
- COUGHTRIE, M. W., R. A. GILISSEN, B. SHEK, R. C. STRANGE, A. A. FRYER, P. W. JONES und D. E. BAMBER (1999). "Phenol sulphotransferase SULT1A1 polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations." *Biochem J* **337** (Pt 1): 45-49.
- COUGHTRIE, M. W., S. SHARP, K. MAXWELL und N. P. INNES (1998). "Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 3-27.
- COURT, M. H., S. X. DUAN, L. L. VON MOLTKE, D. J. GREENBLATT, C. J. PATTEN, J. O. MINERS und P. I. MACKENZIE (2001). "Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(3): 998-1006.

- CRETON, S. K., H. ZHU und N. J. GOODERHAM (2007). "The cooked meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine activates the extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway." *Cancer Res* **67**(23): 11455-11462.
- CROFTS, F. G., P. T. STRICKLAND, C. L. HAYES und T. R. SUTTER (1997). "Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by human cytochrome P4501B1." *Carcinogenesis* **18**(9): 1793-1798.
- CROFTS, F. G., T. R. SUTTER und P. T. STRICKLAND (1998). "Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1." *Carcinogenesis* **19**(11): 1969-1973.
- CUMMINGS, D. A. und H. A. J. SCHUT (1994). "Removal of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the male Fischer 344 rat." *Carcinogenesis* **15**(11): 2623-2628.
- DEBAUN, J. R., J. Y. ROWLEY, E. C. MILLER und J. A. MILLER (1968). "Sulfotransferase activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rodent livers susceptible and resistant to this carcinogen." *Proc Soc Exp Biol Med* **129**(1): 268-273.
- DEY, A., J. E. JONES und D. W. NEBERT (1999). "Tissue- and cell type-specific expression of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized in situ hybridization." *Biochem Pharmacol* **58**(3): 525-537.
- DING, X. und L. S. KAMINSKY (2003). "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 149-173.
- DINGLEY, K. H., K. D. CURTIS, S. NOWELL, J. S. FELTON, N. P. LANG und K. W. TURTELTAUB (1999). "DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(6): 507-512.
- DIPPLE, A., P. D. LAWLEY und P. BROOKES (1968). "Theory of tumour initiation by chemical carcinogens: dependence of activity on structure of ultimate carcinogen." *Eur J Cancer* **4**(5): 493-506.
- DODGSON, K. S. und F. A. ROSE (1970). "Sulfoconjugation and sulfohydrolysis." in: *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*. W. H. Fishman. New York, Academic Press.
- DOLL, R. und R. PETO (1981). "The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today." *J Natl Cancer Inst* **66**(6): 1191-1308.
- DONATH, C. (2008). "Sulfotransferase-vermittelte Genotoxizität von benzyllischen Metaboliten alkylierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe." Universität Potsdam, Dissertation.
- DOOLEY, T. P. (1998). "Molecular biology of the human phenol sulfotransferase gene family." *J Exp Zool* **282**(1-2): 223-230.
- DOOLEY, T. P. und Z. HUANG (1996). "Genomic organization and DNA sequences of two human phenol sulfotransferase genes (STP1 and STP2) on the short arm of chromosome 16." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(1): 134-140.
- DOOLEY, T. P., R. D. OBERMOELLER, E. H. LEITER, H. D. CHAPMAN, C. N. FALANY, Z. DENG und M. J. SICILIANO (1993). "Mapping of the phenol sulfotransferase gene (STP) to human chromosome 16p12.1-p11.2 and to mouse chromosome 7." *Genomics* **18**(2): 440-443.

- DOOLEY, T. P., H. M. MITCHISON, P. B. MUNROE, P. PROBST, M. NEAL, M. J. SICILIANO, Z. DENG, N. A. DOGGETT, D. F. CALLEN, R. M. GARDINER und ET AL. (1994). "Mapping of two phenol sulphotransferase genes, STP and STM, to 16p: candidate genes for Batten disease." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 482-489.
- DOOLEY, T. P., R. HALDEMAN-CAHILL, J. JOINER und T. W. WILBORN (2000). "Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(1): 236-245.
- DUANMU, Z., D. LOCKE, J. SMIGELSKI, W. WU, M. S. DAHN, C. N. FALANY, T. A. KOCAREK und M. RUNGE-MORRIS (2002). "Effects of dexamethasone on aryl (SULT1A1)- and hydroxysteroid (SULT2A1)-sulfotransferase gene expression in primary cultured human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **30**(9): 997-1004.
- EDWARDS, R. J., B. P. MURRAY, S. MURRAY, T. SCHULZ, D. NEUBERT, T. W. GANT, S. S. THORGEIRSSON, A. R. BOOBIS und D. S. DAVIES (1994). "Contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to the activation of heterocyclic amines in monkeys and human." *Carcinogenesis* **15**(5): 829-836.
- ENGELKE, C. E., W. MEINL, H. BOEING und H. GLATT (2000). "Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2." *Pharmacogenetics* **10**(2): 163-169.
- ENGST, W., R. LANDSIEDEL, H. HERMERSDORFER, J. DOEHMER und H. GLATT (1999). "Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells." *Carcinogenesis* **20**(9): 1777-1785.
- ENOKIZONO, J., H. KUSUHARA und Y. SUGIYAMA (2007). "Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases." *Drug Metab Dispos* **35**(6): 922-928.
- ESUMI, H., H. OHGAKI, E. KOHZEN, S. TAKAYAMA und T. SUGIMURA (1989). "Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Jpn J Cancer Res* **80**(12): 1176-1178.
- EVANOFF, B. A., P. GUSTAVSSON und C. HOGSTEDT (1993). "Mortality and incidence of cancer in a cohort of Swedish chimney sweeps: an extended follow up study." *Br J Ind Med* **50**(5): 450-459.
- FALANY, C. N. (1997). "Enzymology of human cytosolic sulfotransferases." *FASEB J* **11**(4): 206-216.
- FALANY, C. N., M. E. VAZQUEZ, J. A. HEROUX und J. A. ROTH (1990). "Purification and characterization of human liver phenol-sulfating phenol sulfotransferase." *Arch Biochem Biophys* **278**(2): 312-318.
- FALANY, J. L. und C. N. FALANY (1997). "Regulation of estrogen activity by sulfation in human MCF-7 breast cancer cells." *Oncol Res* **9**(11-12): 589-596.
- FELTON, J. S., M. G. KNIZE, N. H. SHEN, P. R. LEWIS, B. D. ANDRESEN, J. HAPPE und F. T. HATCH (1986). "The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)." *Carcinogenesis* **7**(7): 1081-1086.
- FELTON, J. S., M. G. KNIZE, C. WOOD, B. J. WUEBBLES, S. K. HEALY, D. H. STUERMER, L. F. BJELDANES, B. J. KIMBLE und F. T. HATCH (1984). "Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef." *Carcinogenesis* **5**(1): 95-102.

- FOLDES, A. und J. L. MEEK (1973). "Rat brain phenolsulfotransferase: partial purification and some properties." *Biochim Biophys Acta* **327**(2): 365-374.
- FRANDSEN, H., S. GRIVAS, R. ANDERSSON, L. DRAGSTED und J. C. LARSEN (1992). "Reaction of the N²-acetoxy derivative of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) with 2'-deoxyguanosine and DNA. Synthesis and identification of N²-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-PhIP." *Carcinogenesis* **13**(4): 629-635.
- FREIMUTH, R. R., M. WIEPERT, C. G. CHUTE, E. D. WIEBEN und R. M. WEINSHILBOUM (2004). "Human cytosolic sulfotransferase database mining: identification of seven novel genes and pseudogenes." *Pharmacogenomics J* **4**(1): 54-65.
- FUJITA, K., K. NAGATA, S. OZAWA, H. SASANO und Y. YAMAZOE (1997). "Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases." *J Biochem (Tokyo)* **122**(5): 1052-1061.
- FUKUTOME, K., M. OCHIAI, K. WAKABAYASHI, S. WATANABE, T. SUGIMURA und M. NAGAO (1994). "Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the ³²P-postlabeling method." *Jpn J Cancer Res* **85**(2): 113-117.
- GASSEN, H. G. und K. MINOL (1996). "Gentechnik." Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- GERHARDSSON DE VERDIER, M., U. HAGMAN, R. K. PETERS, G. STEINECK und E. OVERVIK (1991). "Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm." *Int J Cancer* **49**(4): 520-525.
- GLATT, H. (1997). "Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation." *FASEB J* **11**(5): 314-321.
- GLATT, H. (2000). "Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics." *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 141-170.
- GLATT, H., R. HENSCHLER, D. H. PHILLIPS, J. W. BLAKE, P. STEINBERG, A. SEIDEL und F. OESCH (1990). "Sulfotransferase-mediated chlorination of 1-hydroxymethylpyrene to a mutagen capable of penetrating indicator cells." *Environ Health Perspect* **88**: 43-48.
- GLATT, H., G. WERLE-SCHNEIDER, N. ENDERS, S. MONNERJAHN, J. PUDIL, A. CZICH, A. SEIDEL und M. SCHWARZ (1994). "1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects in vitro and in vivo, and metabolic aspects." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 305-319.
- GLATT, H., I. BARTSCH, S. CHRISTOPH, M. W. COUGHTRIE, C. N. FALANY, M. HAGEN, R. LANDSIEDEL, U. PABEL, D. H. PHILLIPS, A. SEIDEL und Y. YAMAZOE (1998). "Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 195-219.
- GLATT, H., H. BOEING, C. E. ENGELKE, L. MA, A. KUHLOW, U. PABEL, D. POMPLUN, W. TEUBNER und W. MEINL (2001). "Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects." *Mutat Res* **482**(1-2): 27-40.
- GLATT, H., MEINL, W., KUHLOW, A., MA, L. (2003). "Metabolic formation, distribution, and toxicological effects of reactive sulfuric acid esters." *Nova Acta Leopoldina* **87**(329): 151-161.
- GOODERHAM, N. J., H. ZHU, S. LAUBER, A. BOYCE und S. CRETON (2002). "Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)." *Mutat Res* **506-507**: 91-99.
- GOSSLER, A., A. L. JOYNER, J. ROSSANT und W. C. SKARNES (1989). "Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes." *Science* **244**(4903): 463-465.

- GRANVIL, C. P., A. M. YU, G. ELIZONDO, T. E. AKIYAMA, C. CHEUNG, L. FEIGENBAUM, K. W. KRAUSZ und F. J. GONZALEZ (2003). "Expression of the human CYP3A4 gene in the small intestine of transgenic mice: in vitro metabolism and pharmacokinetics of midazolam." *Drug Metab Dispos* **31**(5): 548-558.
- GRIMSRUD, T. K., H. LANGSETH, A. ENGELAND und A. ANDERSEN (1998). "Lung and bladder cancer in a Norwegian municipality with iron and steel producing industry: population based case-control studies." *Occup Environ Med* **55**(6): 387-392.
- GUILLEN, M. D. und P. SOPELANA (2004a). "Load of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils: importance of alkylated derivatives." *J Food Prot* **67**(9): 1904-1913.
- GUILLEN, M. D. und P. SOPELANA (2004b). "Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese." *J Dairy Sci* **87**(3): 556-564.
- GUPTA, R. C., M. V. REDDY und K. RANDEPATH (1982). "³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts." *Carcinogenesis* **3**(9): 1081-1092.
- HAASE, H., G. DOBBERNACK, G. TUNNEMANN, P. KARCEWSKI, C. CARDOSO, D. PETZHOLD, W. P. SCHLEGEL, S. LUTTER, P. PIERSCHALEK, J. BEHLKE und I. MORANO (2006). "Minigenes encoding N-terminal domains of human cardiac myosin light chain-1 improve heart function of transgenic rats." *Faseb J* **20**(7): 865-873.
- HARRIS, C. C., K. VAHAKANGAS, M. J. NEWMAN, G. E. TRIVERS, A. SHAMSUDDIN, N. SINOPOLI, D. L. MANN und W. E. WRIGHT (1985). "Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(19): 6672-6676.
- HASUWA, H., K. KASEDA, T. EINARSDOTTIR und M. OKABE (2002). "Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats." *FEBS Lett* **532**(1-2): 227-230.
- HE, D. und C. N. FALANY (2006). "Characterization of proline-serine-rich carboxyl terminus in human sulfotransferase 2B1b: immunogenicity, subcellular localization, kinetic properties, and phosphorylation." *Drug Metab Dispos* **34**(10): 1749-1755.
- HE, D., A. R. FROST und C. N. FALANY (2005). "Identification and immunohistochemical localization of sulfotransferase 2B1b (SULT2B1b) in human lung." *Biochim Biophys Acta*.
- HE, D., C. A. MELOCHE, N. A. DUMAS, A. R. FROST und C. N. FALANY (2004). "Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate." *Biochem J* **379**(Pt 3): 533-540.
- HEBRING, S. J., A. A. ADJEI, J. L. BAER, G. D. JENKINS, J. ZHANG, J. M. CUNNINGHAM, D. J. SCHAID, R. M. WEINSHILBOUM und S. N. THIBODEAU (2007). "Human SULT1A1 gene: copy number differences and functional implications." *Hum Mol Genet* **16**(5): 463-470.
- HEFLICH, R. H. und R. E. NEFT (1994). "Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites." *Mutat Res* **318**(2): 73-114.
- HEMPEL, N., M. NEGISHI und M. E. MCMANUS (2005). "Human SULT1A genes: cloning and activity assays of the SULT1A promoters." *Methods Enzymol* **400**: 147-165.

- HEMPEL, N., H. WANG, E. L. LECLUYSE, M. E. MCMANUS und M. NEGISHI (2004). "The human sulfotransferase SULT1A1 gene is regulated in a synergistic manner by Sp1 and GA binding protein." *Mol Pharmacol* **66**(6): 1690-1701.
- HER, C., R. RAFTOGIANIS und R. M. WEINSHILBOUM (1996). "Human phenol sulfotransferase STP2 gene: molecular cloning, structural characterization, and chromosomal localization." *Genomics* **33**(3): 409-420.
- HILDEBRANDT, M. A., O. E. SALAVAGGIONE, Y. N. MARTIN, H. C. FLYNN, S. JALAL, E. D. WIEBEN und R. M. WEINSHILBOUM (2004). "Human SULT1A3 pharmacogenetics: gene duplication and functional genomic studies." *Biochem Biophys Res Commun* **321**(4): 870-878.
- HOLLNAGEL, H. M. (2004). "2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin: Bioaktivierung und DNA-Adduktbildung in V79-Zelllinien und verschiedenen Rattengeweben." Universität Potsdam, Dissertation.
- HOWIE, A. F., L. M. FORRESTER, M. J. GLANCEY, J. J. SCHLAGER, G. POWIS, G. J. BECKETT, J. D. HAYES und C. R. WOLF (1990). "Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues." *Carcinogenesis* **11**(3): 451-458.
- HUI, E. K., P. C. WANG und S. J. LO (1998). "Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants." *Cell Mol Life Sci* **54**(12): 1403-1411.
- ITO, N., R. HASEGAWA, M. SANO, S. TAMANO, H. ESUMI, S. TAKAYAMA und T. SUGIMURA (1991). "A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)." *Carcinogenesis* **12**(8): 1503-1506.
- JAGERSTAD, M., K. SKOG, S. GRIVAS und K. OLSSON (1991). "Formation of heterocyclic amines using model systems." *Mutat Res* **259**(3-4): 219-233.
- JONES, A. L., M. HAGEN, M. W. COUGHTRIE, R. C. ROBERTS und H. GLATT (1995). "Human platelet phenolsulfotransferases: cDNA cloning, stable expression in V79 cells and identification of a novel allelic variant of the phenol-sulfating form." *Biochem Biophys Res Commun* **208**(2): 855-862.
- KADERLIK, K. R., R. F. MINCHIN, G. J. MULDER, K. F. ILETT, M. DAUGAARD-JENSON, C. H. TEITEL und F. F. KADLUBAR (1994a). "Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rat extrahepatic tissues." *Carcinogenesis* **15**(8): 1703-1709.
- KADERLIK, K. R., G. J. MULDER, J. G. SHADDOCK, D. A. CASCIANO, C. H. TEITEL und F. F. KADLUBAR (1994b). "Effect of glutathione depletion and inhibition of glucuronidation and sulfation on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) metabolism, PhIP-DNA adduct formation and unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes." *Carcinogenesis* **15**(8): 1711-1716.
- KAMPMAN, E., D. VERHOEVEN, L. SLOOTS und P. VAN 'T VEER (1995). "Vegetable and animal products as determinants of colon cancer risk in Dutch men and women." *Cancer Causes Control* **6**(3): 225-234.
- KASPER, S., P. S. RENNIE, N. BRUCHOVSKY, P. C. SHEPPARD, H. CHENG, L. LIN, R. P. SHIU, R. SNOEK und R. J. MATUSIK (1994). "Cooperative binding of androgen receptors to two DNA sequences is required for androgen induction of the probasin gene." *J Biol Chem* **269**(50): 31763-31769.
- KIM, H. J., J. H. CHO und C. D. KLAASSEN (1995). "Depletion of hepatic 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) and sulfate in rats by xenobiotics that are sulfated." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(2): 654-658.

- KIMURA, S., M. KAWABE, A. YU, H. MORISHIMA, P. FERNANDEZ-SALGUERO, G. J. HAMMONS, J. M. WARD, F. F. KADLUBAR und F. J. GONZALEZ (2003). "Carcinogenesis of the food mutagen PhIP in mice is independent of CYP1A2." *Carcinogenesis* **24**(3): 583-587.
- KING, C. M. und B. PHILLIPS (1968). "Enzyme-catalyzed reactions of the carcinogen N-hydroxy-2-fluorenylacetylamide with nucleic acid." *Science* **159**(821): 1351-1353.
- KONG, A. N., M. MA, D. TAO und L. YANG (1993). "Molecular cloning of cDNA encoding the phenol/aryl form of sulfotransferase (mSTp1) from mouse liver." *Biochim Biophys Acta* **1171**(3): 315-318.
- KUBOTA, H., W. H. GRIEST und M. R. GUERIN (1975). Determination of carcinogens in tobacco smoke and coal-derived samples, trace polynuclear aromatic hydrocarbons, United States.
- KULP, K. S., M. G. KNIZE, M. A. MALFATTI, C. P. SALMON und J. S. FELTON (2000). "Identification of urine metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans." *Carcinogenesis* **21**(11): 2065-2072.
- KULP, K. S., M. G. KNIZE, N. D. FOWLER, C. P. SALMON und J. S. FELTON (2004). "PhIP metabolites in human urine after consumption of well-cooked chicken." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **802**(1): 143-153.
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-209.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- LANDSIEDEL, R. (1998). "Stoffwechsel und Mutagenität benzylischer Verbindungen." Berlin, Logos-Verlag.
- LANGOUET, S., A. PAEHLER, D. H. WELTI, N. KERRIGUY, A. GUILLOUZO und R. J. TURESKY (2002). "Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rat and human hepatocytes." *Carcinogenesis* **23**(1): 115-122.
- LAYTON, D. W., K. T. BOGEN, M. G. KNIZE, F. T. HATCH, V. M. JOHNSON und J. S. FELTON (1995). "Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research." *Carcinogenesis* **16**(1): 39-52.
- LEFF, M. A., P. N. EPSTEIN, M. A. DOLL, A. J. FRETLAND, U. S. DEVANABOYINA, T. D. RUSTAN und D. W. HEIN (1999). "Prostate-specific human N-acetyltransferase 2 (NAT2) expression in the mouse." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(1): 182-187.
- LIEHR, T. (2006). "Application of yeast artificial chromosomes in fluorescence in situ hybridization." *Methods Mol Biol* **349**: 175-186.
- LIEHR, T., H. STARKE, A. HELLER, N. KOSYAKOVA, K. MRASEK, M. GROSS, C. KARST, U. STEINHAEUSER, F. HUNSTIG, I. FICKELSCHER, A. KUECHLER, V. TRIFONOV, S. A. ROMANENKO und A. WEISE (2006). "Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding." *Cytogenet Genome Res* **114**(3-4): 240-244.
- LIN, D., K. R. KADERLIK, R. J. TURESKY, D. W. MILLER, J. O. LAY, JR. und F. F. KADLUBAR (1992). "Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, with DNA." *Chem Res Toxicol* **5**(5): 691-697.

- LIN, D., D. J. MEYER, B. KETTERER, N. P. LANG und F. F. KADLUBAR (1994). "Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis." *Cancer Res* **54**(18): 4920-4926.
- LIN, D. X., N. P. LANG und F. F. KADLUBAR (1995). "Species differences in the biotransformation of the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by hepatic microsomes and cytosols from humans, rats, and mice." *Drug Metab Dispos* **23**(4): 518-524.
- LYNCH, A. M., N. J. GOODERHAM und A. R. BOOBIS (1996). "Organ distinctive mutagenicity in muta(TM)mouse after short-term exposure to PhIP." *Mutagenesis* **11**(5): 505-509.
- MA, L. (2001). "Mercaptursäure und Nukleosidaddukt im Harn als Biomarker in 1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten." Universität Potsdam, Dissertation.
- MA, L., KUHLOW, A., GLATT, H. (2002). "Ethanol enhances the Activation of 1-Hydroxymethylpyrene to DNA Adduct-forming Species in the Rat." *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**: 933-946.
- MA, L., A. KUHLOW und H. GLATT (2003). "Albumin strongly prolongs the lifespan of chemically reactive sulphuric acid esters and affects their biological activities in the rat." *Nova Acta Leopoldina* **87**(329): 265-272.
- MA, X., J. R. IDLE, M. A. MALFATTI, K. W. KRAUSZ, D. W. NEBERT, C. S. CHEN, J. S. FELTON, D. J. WAXMAN und F. J. GONZALEZ (2006). "Mouse lung CYP1A1 catalyzes the metabolic activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)." *Carcinogenesis*: 732-737.
- MACGREGOR, G. R. und P. A. OVERBEEK (1991). "Use of a simplified single-site PCR to facilitate cloning of genomic DNA sequences flanking a transgene integration site." *PCR Methods Appl* **1**(2): 129-135.
- MAHER, V. M., J. L. YANG, M. C. MAH und J. J. MCCORMICK (1989). "Comparing the frequency and spectra of mutations induced when an SV-40 based shuttle vector containing covalently bound residues of structurally-related carcinogens replicates in human cells." *Mutat Res* **220**(2-3): 83-92.
- MALFATTI, M. A., K. S. KULP, M. G. KNIZE, C. DAVIS, J. P. MASSENGILL, S. WILLIAMS, S. NOWELL, S. MACLEOD, K. H. DINGLEY, K. W. TURTELTAUB, N. P. LANG und J. S. FELTON (1999). "The identification of [2-(14)C]2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine metabolites in humans." *Carcinogenesis* **20**(4): 705-713.
- MANCINI, M. A., C. S. SONG, T. R. RAO, B. CHATTERJEE und A. K. ROY (1992). "Spatio-temporal expression of estrogen sulfotransferase within the hepatic lobule of male rats: implication of in situ estrogen inactivation in androgen action." *Endocrinology* **131**(3): 1541-1546.
- MCLEMORE, T. L., S. ADELBERG, M. C. LIU, N. A. MCMAHON, S. J. YU, W. C. HUBBARD, M. CZERWINSKI, T. G. WOOD, R. STORENG, R. A. LUBET und ET AL. (1990). "Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas." *J Natl Cancer Inst* **82**(16): 1333-1339.
- MEINL, W. und H. GLATT (2001). "Structure and localization of the human SULT1B1 gene: neighborhood to SULT1E1 and a SULT1D pseudogene." *Biochem Biophys Res Commun* **288**(4): 855-862.

- MEINL, W., J. H. MEERMAN und H. GLATT (2002). "Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*." *Pharmacogenetics* **12**(9): 677-689.
- MEINL, W., U. PABEL, M. OSTERLOH-QUIROZ, J. G. HENGSTLER und H. GLATT (2006). "Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue." *Int J Cancer* **118**(5): 1090-1097.
- MILLER, E. C. und J. A. MILLER (1947). "The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed *p*-dimethylaminoazobenzene." *Cancer Res* **7**: 468-480.
- MILLER, J. A. (1970). "Carcinogenesis by chemicals: an overview – G. H. A. Clowes memorial lecture." *Cancer Res* **30**(3): 559-576.
- MILLER, J. A. (1994). "Sulfonation in chemical carcinogenesis – history and present status." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 329-341.
- MOONEN, H. J., J. J. BRIEDE, J. M. VAN MAANEN, J. C. KLEINJANS und T. M. DE KOK (2002). "Generation of free radicals and induction of DNA adducts by activation of heterocyclic aromatic amines via different metabolic pathways in vitro." *Mol Carcinog* **35**(4): 196-203.
- MOONEN, H. J., Y. E. DOMMELS, M. VAN ZWAM, M. H. VAN HERWIJNEN, J. C. KLEINJANS, G. M. ALINK und T. M. DE KOK (2004). "Effects of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-mediated DNA adduct formation by heterocyclic aromatic amines in human adenocarcinoma colon cells." *Mol Carcinog* **40**(3): 180-188.
- MUCKEL, E., H. FRANSDEN und H. R. GLATT (2002). "Heterologous expression of human N-acetyltransferases 1 and 2 and sulfotransferase 1A1 in *Salmonella typhimurium* for mutagenicity testing of heterocyclic amines." *Food Chem Toxicol* **40**(8): 1063-1068.
- MULDER, G. J. und W. B. JAKOBY (1990). *Sulfation. Conjugation Reactions in Drug Metabolism: An Integrated Approach*. G. J. Mulder. London, Taylor and Francis.
- NAGATA, K. und Y. YAMAZOE (2000). "Pharmacogenetics of sulfotransferase." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 159-176.
- NAGY, A., M. GERSENSTEIN und K. VINTERSEN (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- NEBERT, D. W. (1994). "Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription." *Biochem Pharmacol* **47**(1): 25-37.
- NIEHRS, C., R. BEISSWANGER und W. B. HUTTNER (1994). "Protein tyrosine sulfation, 1993--an update." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 257-271.
- NIEMANN, H., R. HALTER, J. W. CARNWATH, D. HERRMANN, E. LEMME und D. PAUL (1999). "Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep." *Transgenic Res* **8**(3): 237-247.
- NOGUCHI, A., N. TAKEKAWA, T. EINARSDOTTIR, M. KOURA, Y. NOGUCHI, K. TAKANO, Y. YAMAMOTO, J. MATSUDA und O. SUZUKI (2004). "Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking." *Exp Anim* **53**(2): 103-111.
- OCHIAI, M., H. IMAI, T. SUGIMURA, M. NAGAO und H. NAKAGAMA (2002). "Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Jpn J Cancer Res* **93**(5): 478-483.

- OZAWA, S., K. NAGATA, D. W. GONG, Y. YAMAZOE und R. KATO (1990). "Nucleotide sequence of a full-length cDNA (PST-1) for aryl sulfotransferase from rat liver." *Nucleic Acids Res* **18**(13): 4001.
- OZAWA, S., K. NAGATA, M. SHIMADA, M. UEDA, T. TSUZUKI, Y. YAMAZOE und R. KATO (1995). "Primary structures and properties of two related forms of aryl sulfotransferases in human liver." *Pharmacogenetics* **5 Spec No**: S135-140.
- OZAWA, S., Y. M. TANG, Y. YAMAZOE, R. KATO, N. P. LANG und F. F. KADLUBAR (1998). "Genetic polymorphisms in human liver phenol sulfotransferases involved in the bioactivation of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines and heterocyclic amines." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 237-248.
- PALMITER, R. D., R. L. BRINSTER, R. E. HAMMER, M. E. TRUMBAUER, M. G. ROSENFELD, N. C. BIRNBERG und R. M. EVANS (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." *Nature* **300**(5893): 611-615.
- PERERA, F. P., L. A. MOONEY, C. P. DICKEY, R. M. SANTELLA, D. BELL, W. BLANER, D. TANG und R. M. WHYATT (1996). "Molecular epidemiology in environmental carcinogenesis." *Environ Health Perspect* **104 Suppl 3**: 441-443.
- PFAU, W., U. BROCKSTEDT, K. D. SÖHREN und H. MARQUARDT (1994). "³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by food-derived heterocyclic amines: evidence for incomplete hydrolysis and a procedure for adduct pattern simplification." *Carcinogenesis* **15**(5): 877-882.
- PROCHASKA, H. J. und P. TALALAY (1988). "Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver." *Cancer Res* **48**(17): 4776-4782.
- RAFTOGIANIS, R. B., C. HER und R. M. WEINSHILBOUM (1996). "Human phenol sulfotransferase pharmacogenetics: STP1 gene cloning and structural characterization." *Pharmacogenetics* **6**(6): 473-487.
- RAFTOGIANIS, R. B., T. C. WOOD, D. M. OTTERNESS, J. A. VAN LOON und R. M. WEINSHILBOUM (1997). "Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype." *Biochem Biophys Res Commun* **239**(1): 298-304.
- RAFTOGIANIS, R. B., T. C. WOOD und R. M. WEINSHILBOUM (1999). "Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations." *Biochem Pharmacol* **58**(4): 605-616.
- RAJKOWSKI, K. M., P. ROBEL und E. E. BAULIEU (1997). "Hydroxysteroid sulfotransferase activity in the rat brain and liver as a function of age and sex." *Steroids* **62**(5): 427-436.
- RATGE, D., K. P. KOHSE, U. STEEGMULLER und H. WISSER (1991). "Distribution of free and conjugated catecholamines between plasma, platelets and erythrocytes: different effects of intravenous and oral catecholamine administrations." *J Pharmacol Exp Ther* **257**(1): 232-238.
- REDDY, M. V. und K. RANDEATH (1986). "Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts." *Carcinogenesis* **7**(9): 1543-1551.
- RICE, J. E., A. RIVENSON, J. BRALEY und E. J. LAVOIE (1987). "Methylated derivatives of pyrene and fluorene: evaluation of genotoxicity in the hepatocyte/DNA repair test and tumorigenic activity in newborn mice." *J Toxicol Environ Health* **21**(4): 525-532.

- RIKKE, B. A. und A. K. ROY (1996). "Structural relationships among members of the mammalian sulfotransferase gene family." *Biochim Biophys Acta* **1307**(3): 331-338.
- RILEY, E., R. BOLTON-GROB, N. LIYOU, C. WONG, M. TRESILLIAN und M. E. MCMANUS (2002). "Isolation and characterisation of a novel rabbit sulfotransferase isoform belonging to the SULT1A subfamily." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(8): 958-969.
- ROBBINS, P. W. und F. LIPMANN (1957). "Isolation and identification of active sulfate." *J Biol Chem* **229**(2): 837-851.
- ROY, A. K. (1992). "Regulation of steroid hormone action in target cells by specific hormone-inactivating enzymes." *Proc Soc Exp Biol Med* **199**(3): 265-272.
- RUBIN, G. L., S. SHARP, A. L. JONES, H. GLATT, J. A. MILLS und M. W. COUGHTRIE (1996). "Design, production and characterization of antibodies discriminating between the phenol- and monoamine-sulphating forms of human phenol sulphotransferase." *Xenobiotica* **26**(11): 1113-1119.
- RUSHMORE, T. H. und A. N. KONG (2002). "Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes." *Curr Drug Metab* **3**(5): 481-490.
- SAEKI, Y., Y. SAKAKIBARA, Y. ARAKI, K. YANAGISAWA, M. SUIKO, H. NAKAJIMA und M. C. LIU (1998). "Molecular cloning, expression, and characterization of a novel mouse liver SULT1B1 sulfotransferase." *J Biochem (Tokyo)* **124**(1): 55-64.
- SAKAKIBARA, Y., Y. TAKAMI, C. ZWIEB, T. NAKAYAMA, M. SUIKO, H. NAKAJIMA und M. C. LIU (1995). "Purification, characterization, and molecular cloning of a novel rat liver Dopa/tyrosine sulfotransferase." *J Biol Chem* **270**(51): 30470-30478.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHADE, N. (2008). "Transgene Mäuse für humane SULT1A1/1A2: Expression der humanen Proteine und DNA-Adduktbildung durch das heterozyklische aromatische Amin PhIP in verschiedenen Geweben." Universität Potsdam, Diplomarbeit.
- SCHAUSS, S. J., T. HENRY, R. PALMATIER, L. HALVORSON, R. DANNENBRING und J. D. BECKMANN (1995). "Characterization of bovine tracheobronchial phenol sulphotransferase cDNA and detection of mRNA regulation by cortisol." *Biochem J* **311** (Pt 1): 209-217.
- SCHENKEL, J. (2004). "Activation of the c-Jun transcription factor following neurodegeneration in vivo." *Neurosci Lett* **361**(1-3): 36-39.
- SHARP, S., M. W. COUGHTRIE, K. J. FORBES und R. HUME (1995). "Preparation and characterization of anti-peptide antibodies directed against human phenol and hydroxysteroid sulphotransferases." *J Pharmacol Toxicol Methods* **34**(2): 89-95.
- SHIMADA, T., C. L. HAYES, H. YAMAZAKI, S. AMIN, S. S. HECHT, F. P. GUENGERICH und T. R. SUTTER (1996). "Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1." *Cancer Res* **56**(13): 2979-2984.
- SHIRAI, T., M. SANO, S. TAMANO, S. TAKAHASHI, M. HIROSE, M. FUTAKUCHI, R. HASEGAWA, K. IMAIDA, K. MATSUMOTO, K. WAKABAYASHI, T. SUGIMURA und N. ITO (1997). "The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) derived from cooked foods." *Cancer Res* **57**(2): 195-198.
- SILVERSTEIN, M., N. MAIZLISH, R. PARK und F. MIRER (1985). "Mortality among workers exposed to coal tar pitch volatiles and welding emissions: an exercise in epidemiologic triage." *Am J Public Health* **75**(11): 1283-1287.

- SINHA, R., W. H. CHOW, M. KULLDORFF, J. DENOBILE, J. BUTLER, M. GARCIA-CLOSAS, R. WEIL, R. N. HOOVER und N. ROTHMAN (1999). "Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas." *Cancer Res* **59**(17): 4320-4324.
- SINHA, R. und N. ROTHMAN (1999). "Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer." *Cancer Lett* **143**(2): 189-194.
- SMITH, B. A., J. R. SPRINGFIELD und H. R. GUTMANN (1986). "Interaction of the synthetic ultimate carcinogens, N-sulfony- and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene, and of enzymatically activated N-hydroxy-2-acetylaminofluorene with nucleophiles." *Carcinogenesis* **7**(3): 405-411.
- STANLEY, L. A., I. G. MILLS und E. SIM (1997). "Localization of polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) in tissues of inbred mice." *Pharmacogenetics* **7**(2): 121-130.
- SUGIMURA, T. (1997). "Overview of carcinogenic heterocyclic amines." *Mutat Res* **376**(1-2): 211-219.
- SUGIMURA, T., K. WAKABAYASHI, H. NAKAGAMA und M. NAGAO (2004). "Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish." *Cancer Sci* **95**(4): 290-299.
- SURH, Y. J., J. C. BLOMQUIST, A. LIEM und J. A. MILLER (1990). "Metabolic activation of 9-hydroxymethyl-10-methylanthracene and 1-hydroxymethylpyrene to electrophilic, mutagenic and tumorigenic sulfuric acid esters by rat hepatic sulfotransferase activity." *Carcinogenesis* **11**(9): 1451-1460.
- SURH, Y. J. und J. A. MILLER (1994). "Roles of electrophilic sulfuric acid ester metabolites in mutagenesis and carcinogenesis by some polynuclear aromatic hydrocarbons." *Chem-Biol Interact* **92**(1-3): 351-362.
- SUZUKI, O., T. HATA, N. TAKEKAWA, M. KOURA, K. TAKANO, Y. YAMAMOTO, Y. NOGUCHI, K. UCHIO-YAMADA und J. MATSUDA (2006). "Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line." *Exp Anim* **55**(1): 65-69.
- TANAKA, T., R. SUZUKI, H. KOHNO, S. SUGIE, M. TAKAHASHI und K. WAKABAYASHI (2005). "Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase." *Carcinogenesis* **26**(1): 229-238.
- TEUBNER, W., W. MEINL, S. FLORIAN, M. KRETZSCHMAR und H. GLATT (2007). "Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract." *Biochem J* **404**(2): 207-215.
- THOMPSON, L. H., J. D. TUCKER, S. A. STEWART, M. L. CHRISTENSEN, E. P. SALAZAR, A. V. CARRANO und J. S. FELTON (1987). "Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus *Salmonella* mutagenicity." *Mutagenesis* **2**(6): 483-487.
- TSOI, C., C. N. FALANY, R. MORGENSTERN und S. SWEDMARK (2001). "Molecular cloning, expression, and characterization of a canine sulfotransferase that is a human ST1B2 ortholog." *Arch Biochem Biophys* **390**(1): 87-92.
- TURESKY, R. J., A. CONSTABLE, L. B. FAY und F. P. GUENGERICH (1999). "Interspecies differences in metabolism of heterocyclic aromatic amines by rat and human P450 1A2." *Cancer Lett* **143**(2): 109-112.
- TURTELTAUB, K. W., M. G. KNIZE, S. K. HEALY, J. D. TUCKER und J. S. FELTON (1989). "The metabolic disposition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in the induced mouse." *Food Chem Toxicol* **27**(10): 667-673.

- VADOLAS, J., H. WARDAN, M. BOSMANS, F. ZAIBAK, D. JAMSAI, L. VOULLAIRE, R. WILLIAMSON und P. A. IOANNOU (2005). "Transgene copy number-dependent rescue of murine beta-globin knockout mice carrying a 183 kb human beta-globin BAC genomic fragment." *Biochim Biophys Acta* **1728**(3): 150-162.
- VAN LIESHOUT, E. M. M., M. M. G. BEDAF, M. PIETER, C. EKKEL, W. A. NIJHOFF und W. H. M. PETERS (1998). "Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels." *Carcinogenesis* **19**(11): 2055-2057.
- VAN LIESHOUT, E. M. M., D. M. TIEMESSEN, W. H. M. PETERS und J. J.B.M.J. (1997). "Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on glutathione S-transferases of the rat digestive tract." *Carcinogenesis* **18**(3): 485-490.
- WAKABAYASHI, K., M. NAGAO, H. ESUMI und T. SUGIMURA (1992). "Food-derived mutagens and carcinogens." *Cancer Res* **52**(Suppl.): 2092s-2098s.
- WALLIN, H., A. MIKALSEN, F. P. GUENGERICH, M. INGELMAN-SUNDBERG, K. E. SOLBERG, O. J. ROSSLAND und J. ALEXANDER (1990). "Differential rates of metabolic activation and detoxication of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by different cytochrome P450 enzymes." *Carcinogenesis* **11**(3): 489-492.
- WANG, J., J. L. FALANY und C. N. FALANY (1998). "Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver." *Mol Pharmacol* **53**(2): 274-282.
- WARE, J. A. und C. K. SVENSSON (1996). "Longitudinal distribution of arylamine N-acetyltransferases in the intestine of the hamster, mouse, and rat. Evidence for multiplicity of N-acetyltransferases in the intestine." *Biochem Pharmacol* **52**(10): 1613-1620.
- WATABE, T., T. ISHIZUKA, M. ISOBE und N. OZAWA (1982). "A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene." *Science* **215**(4531): 403-405.
- WATANABE, T., Y. KASHIDA, K. YASUHARA, T. KOUJITANI, M. HIROSE und K. MITSUMORI (2002). "Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea." *Cancer Lett* **188**(1-2): 39-46.
- WEINSHILBOUM, R. M. (1986). "Sulfate conjugation of neurotransmitters and drugs. Introduction." *Fed Proc* **45**(8): 2220-2222.
- WEINSHILBOUM, R. M., D. M. OTTERNESS, I. A. AKSOY, T. C. WOOD, C. HER und R. B. RAFTOGIANIS (1997). "Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes." *Faseb J* **11**(1): 3-14.
- WHITNALL, M. H., W. J. DRISCOLL, Y. C. LEE und C. A. STROTT (1993). "Estrogen and hydroxysteroid sulfotransferases in guinea pig adrenal cortex: cellular and sub-cellular distributions." *Endocrinology* **133**(5): 2284-2291.
- WIESE, F. W., P. A. THOMPSON und F. F. KADLUBAR (2001). "Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2." *Carcinogenesis* **22**(1): 5-10.
- WILBORN, T. W., K. A. COMER, T. P. DOOLEY, I. M. REARDON, R. L. HEINRIKSON und C. N. FALANY (1993). "Sequence analysis and expression of the cDNA for the phenol-sulfating form of human liver phenol sulfotransferase." *Mol Pharmacol* **43**(1): 70-77.
- WINDMILL, K. F., A. CHRISTIANSEN, J. T. TEUSNER, C. R. BHASKER, D. J. BIRKETT, X. ZHU und M. E. MCMANUS (1998). "Localisation of aryl sulfotransferase expression in human tissues using hybridisation histochemistry and immunohistochemistry." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 341-346.

- WOOD, T. C., I. A. AKSOY, S. AKSOY und R. M. WEINSHILBOUM (1994). "Human liver thermolabile phenol sulfotransferase: cDNA cloning, expression and characterization." *Biochem Biophys Res Commun* **198**(3): 1119-1127.
- XING, L., M. SALAS, C. S. LIN, W. ZIGMAN, W. SILVERMAN, S. SUBRAMANIAM, V. V. MURTY und B. TYCKO (2007). "Faithful tissue-specific expression of the human chromosome 21-linked COL6A1 gene in BAC-transgenic mice." *Mamm Genome* **18**(2): 113-122.
- YAMAZOE, Y., K. NAGATA, S. OZAWA und R. KATO (1994). "Structural similarity and diversity of sulfotransferases." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 107-117.
- YU, M. und R. A. HITES (1981). "Identification of organic compounds on diesel engine soot." *Anal Chem* **53**: 951-954.
- ZHAI, W., C. CHEN, X. ZHU, X. CHEN, D. ZHANG, X. LI und L. ZHU (2004). "Analysis of T-DNA- Xa21 loci and bacterial blight resistance effects of the transgene Xa21 in transgenic rice." *Theor Appl Genet* **109**(3): 534-542.
- ZHENG, W., D. R. GUSTAFSON, R. SINHA, J. R. CERHAN, D. MOORE, C. P. HONG, K. E. ANDERSON, L. H. KUSHI, T. A. SELLERS und A. R. FOLSOM (1998). "Well-done meat intake and the risk of breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **90**(22): 1724-1729.
- ZHU, X., M. E. VERONESE, C. C. BERNARD, L. N. SANSOM und M. E. MCMANUS (1993a). "Identification of two human brain aryl sulfotransferase cDNAs." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 120-127.
- ZHU, X., M. E. VERONESE, L. N. SANSOM und M. E. MCMANUS (1993b). "Molecular characterisation of a human aryl sulfotransferase cDNA." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(2): 671-676.

Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, in der Abteilung Ernährungstoxikologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt und Herrn Dr. Walter Meinel.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit den aufgeführten Mitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin, den

Gisela Dobbernack

03.11.2008

Gisela Dobbernack

Danksagung

Allen Personen, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit danken.

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Hansruedi Glatt, der es mir ermöglichte, dieses interessante Projekt in der gut ausgestatteten Etox zu bearbeiten, der meine toxikologische Weiterbildung förderte und mir Gelegenheit gab, meine Ergebnisse zu präsentieren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Walter Meinl bedanken. Seine intensive Betreuung, seine vielen Ratschläge und Ideen, seine Bereitschaft, jederzeit Ergebnisse zu diskutieren und neue Strategien zu entwickeln sowie sein offenes Ohr für alle „Mäusesorgen“ haben viel dazu beigetragen, dass ich die Arbeit mit Freude und Schwung verfolgt habe.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Dr. Simone Florian bedanken. Ich habe von Ihrer großen Erfahrung in der Immunhistochemie sehr profitieren dürfen. Bei der Planung und Durchführung der Tierversuche stand sie mir immer zur Seite. Ihre Ratschläge und Erklärungen sowie ihr genaues und kritisches Gegenlesen des Manuskripts dieser Arbeit haben mir sehr geholfen.

Vielen herzlichen Dank an Korinna Wend für die Hilfe bei Western Blot und PAPS-Assay zu „Studentische Hilfskraft-Zeiten“ und das Korrekturlesen. Da hatte ich schon großes Glück mit einer so einer lieben, fröhlichen und allzeit hilfsbereiten „Mäusegenossin“!

Elke Thom möchte ich für die Unterstützung bei den Tierversuchen und die professionellen Tierpräparationen danken. Herzlicher Dank geht an Swetlana König, die die transgenen Mauslinien so außerordentlich sorgfältig und kompetent gepflegt hat.

Bei Nicole Schade möchte ich mich für die Durchführung des PhIP-Postlabel-Experimente im Rahmen ihrer Diplomarbeit und ihre helfende Hand und sorgfältige Arbeit als studentische Hilfskraft herzlich bedanken. Judith Duhse danke ich für die genaue und geduldige Arbeit während ihres Praktikums.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Sabine Braune bedanken. Ihre Hilfe bei den Tierpräparationen, ihre Erfahrungen im Western Blotting und ihre fröhliche und unkomplizierte Art, mit der sie das oft sehr lebhaft große Labor organisiert, habe ich sehr geschätzt.

Herzlich danken möchte ich auch der schwer umkämpften Christine Gumz für die Durchführung der Postlabel-Experimente für 1-HMP, Jutta Schwenk für die Hilfe bei der Lymphozytenaufarbeitung, Elisabeth Meyer für die Anfertigung und Bearbeitung der Gewebeschnitte, Martina Scholtyssek für die Aufarbeitung der 1-HMP-Proben und Andrea Katschak für die Hilfe bei den Echtzeit-PCR-Experimenten.

Dr. Heinz Himmelbauer und Ingo Voigt möchte ich dafür danken, dass sie die Mikroinjektionen zur Erzeugung der transgenen Mauslinien ermöglicht bzw. durchgeführt haben und Dr. Thomas Liehr und seinen Mitarbeitern möchte ich für die Durchführung der FISH-Experimente danken.

Einen herzlichen Dank auch an meine lieben Mit-Doktorandinnen Chimgee Baasanjav, Claudia Donath, Korinna Wend, Mandy Osterloh-Quiroz, Monika Batke und Yasmin Sommer für das freundliche und hilfsbereite Miteinander und an die ganze Abteilung Etox für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit!